

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – КМР. 1764 “С” 2020.11.12. 03 ПЗ

КУЧЕРЯВОГО ІЛІ ІГОРОВИЧА

2021 р.

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет (ННІ) захисту рослин, біотехнології та екології

УДК 604.6 : 633.1

НУБІП України

ПОГОДЖЕНО
Дека́н факультету (Директор ННІ)

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри

(назва факультету (ННІ))

(назва кафедри)

НУБІП України

(підпис)

“ ”

(ННІ)

20__ р.

(підпис)

“ ”

(ІІБ)

20__ р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ТЕМУ «ОЦІНКА СОРТІВ ТА ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ЗА ДІЯННЯМИ
ГОСПОДАРЧО-ЦІННИХ ОЗНАК БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ
МЕТОДАМИ»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми: освітньо-професійна

НУБІП України

Гарант освітньої програми

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

(ІІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

НУБІП України

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

(ІІБ)

Виконав

(підпис)

(ІІБ студента)

НУБІП України

Київ – 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет (ННД) _____

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри _____

НУБІП України

(науковий ступінь, вчене звання) _____

(підпис)

(ГПБ)

20

року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

НУБІП України

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність _____

(код і назва)

Освітня програма _____

(назва)

Орієнтація освітньої програми _____

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи _____

НУБІП України

затверджена наказом ректора НУБІП України від "____" 20 ____ р. № _____

Термін подання завершеної роботи на кафедру _____

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи _____

НУБІП України

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. _____

2. _____

3. _____

Перелік графічного матеріалу (за потреби) _____

НУБІП України

Дата видачі завдання "____" 20 ____ р. _____

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____

(підпис)

(прізвище та ініціали студента)

НУБІП України

Реферат

Тема магістерської роботи – «Оцінка сортів та ліній пшениці м'якої за генами господарчо-цінних ознак біотехнологічними методами». Робота містить

72 сторінки, 3 розділи: 1 розділ містить 7 підрозділів; 2 розділ містить 7 підрозділів; 3 розділ містить 3 підрозділи, 75 пунктів наукової літератури. Робота вміщує в собі 29 ілюстрацію і 7 таблиць.

Об'єктом дослідження було ідентифікація генів господарчо-цінних ознак до грибних захворювань (в роботі було взято таке захворювання як стеблова іржа та наявність алелів локусу запасних білків у пшениці). Предметом дослідження були визначення оцінки за генами господарчо-цінних до стеблової іржі сортів та ліній пшениці м'якої та наявність алелів локусу запасних білків. Метою роботи було дослідження сортів та ліній пшениці м'якої за генами стійкості до грибних захворювань за допомогою молекулярних маркерів та їх біотехнологічна оцінка.

В першому розділі висвітлено основні положення про молекулярні маркери, їхні характеристики, різноманіття та ціль їхнього використання. Охарактеризовано використання молекулярних маркерів для такої важливої сільськогосподарської культури як пшениця м'яка *Triticum aestivum*.

В другому розділі магістерської роботи було викладено детальний опис методів молекулярної біології, а саме метод полімеразно-ланцюгової реакції (далі ПЛР) з подальшою візуалізацією методом електрофорезу, інформація про використані молекулярні маркери для визначення тих чи інших генів стійкості і умови ПЛР щодо них.

В третьому розділі було описано основні результати досліджень, згідно з якими у ході проведення досліджень було ідентифіковано, що більшість представлених для аналізу сортів є стійкими до стеблової іржі (60 % від усіх зразків представлених для аналізу), а також мають у своєму генотипі алелі локусу *Glu-B1*, а саме алель *Glu-B1u* (80 %) та *Glu-B1a1* (20 %).

ЗМІСТ	
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1 Маркерний добір під час селекційного відбору с/г культур	8
1.2 Шкодочинність збудників хвороб пшениці м'якої	11
1.2.1 Бура листкова іржа (<i>Puccinia recondita</i> Roberge et Diem)	13
1.2.2 Піренофороз (<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Drechsler)	15
1.2.3. Фузаріоз колоса (<i>Fusarium graminearum</i>)	19
1.3 Молекулярні маркери як один з елементів біотехнології	22
1.4 Впровадження молекулярних маркерів для селекційного відбору пшениці м'якої	26
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
2.1 Об'єкт дослідження	33
2.1.1. Загальна характеристика пшениці як модельного організму	33
2.1.2. Гени стійкості до грибних хвороб у пшениці м'якої	35
2.2. Методи дослідження	40
2.2.1. Методика проведення виділення ДНК з насіння пшениці м'якої	40
2.2.2. Протокол проведення ПЛР-аналізу	41
2.2.3. Методика проведення процесу електрофорезу та візуалізації результатів	44
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
3.1 Аналіз ліній пшениці м'якої на наявність гена стійкості <i>Sr33</i>	48
3.2 Ідентифікація гена стійкості <i>Sr39</i> у лініях пшениці м'якої	56
3.3 Визначення генів ознак хлібопекарської якості за допомогою молекулярних маркерів	58
ВИСНОВКИ	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	64

ВСТУП

Молекулярні маркери – це досить невеликого розміру послідовності ДНК, які мають визначене розташування в геномі, які можуть розрізняти різні ознаки

певного виду об'єкта дослідження, що можуть зацікавити селекціонерів-дослідників. Під час застосування таких ДНК-маркерів дані гени, які

визначаються ними, досить швидко та напрочуд просто можуть бути аналізовані на початковій стадії розвитку культури рослин. Як результат це може бути і

знайдення генів стійкості до грибних хвороб сільськогосподарських культур простим способом – це виділення ДНК та проведення полімеразно-ланцюгової

реакції з даним матеріалом і їх подальша візуалізація із застосуванням методу електрофорезу. Дані ДНК-маркери можуть досить сильно пришвидшити

ефективність селекціонування культур певних видів с/г рослин.

Без такого сучасного на сьогоднішній момент виду технологій потрібно

було б досить довго чекати поки культура рослини дійде до свого піку зростання і розвитку, щоб проаналізувати дослідниками ті всі характеристики та ознаки, які

їм конче потрібні. Як приклад можна взяти те, що науковці проводять процес схрещування двох батьківських ліній між собою і потім проводять висадку

отриманого посадкового матеріалу. Потім іде процес відбирання частини рослини, це може бути як стебло, чи листок неважливо і проводять з даним

матеріалом певні маніпуляції, щоб ідентифікувати ДНК самої рослини.

Коли результат дослідження дає зрозуміти, що в представленому матеріалі міститься даний маркер, це може означати, що у даній лінії чи сорту рослин може

бути знайдена та ознака, яка є цінною для дослідника. За допомогою таких ДНК-маркерів протягом двох днів можна цілком в достатній кількості виявити даний

ген в сортах та лініях культури рослин, що потрібні для селекціонування. Це дає змогу зробити попередній огляд та відбір більш стійких до певних хвороб

культур рослин і ідентифікувати їх.

Підібраний для аналізу певний посадковий матеріал далі проходить перевірку в умовах посадки в спеціальних відведених полях, що достатньо

чітко визначає ефективність самого процесу селекціонування.

Вибір геному є так би мовити своєрідним продовженням традиційної маркерної технології (MAS), що давало відтворити кращий та більш надійний відбір при виборі найкращих гібридних партнерів у час утворення майбутніх сортів. Оскільки вартість аналізу молекулярних маркерів значно зменшилася, одночасно можна аналізувати різні маркери рослини.

Використання такого процесу як геномна селекція у селекційних дослідженнях сприяє збільшенню ефективності селекції та її прогресу.

Мета роботи – аналіз та ідентифікація сортів та ліній пшениці за генами господарчо-цінних ознак з використанням молекулярних маркерів

Завдання, які потрібно виконати у ході науково-дослідної роботи:

1. Збір та аналіз наукової інформації щодо тематики наукового дослідження, підготовка матеріалу для дослідження та маркерний добір;
2. Ідентифікація генів господарчо-цінних ознак у представлених сортах та лініях пшениці м'якої за допомогою молекулярних маркерів;
3. Визначення стійких сортів та ліній пшениці та їх оцінка в селекції

Об'єктом дослідження є ідентифікація генів господарчо-цінних ознак пшениці м'якої

Предметом дослідження є оцінка за генами господарчо-цінних ознак сортів та ліній пшениці м'якої української селекції до грибних захворювань та наявність алелів локусу *Glu-B1*.

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ І ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Маркерний добір під час селекційного відбору с/г культур

На сьогоднішній день у таких наукових галузях, як генетика та біотехнологія рослин важливою характеристикою відмічено саме збільшення коефіцієнта ефективності добору культур рослин для подальшого розведення та селекції [1, 11]. Селекція рослин є одним із ефективних факторів підвищення урожайності культур рослин (рис. 1.1). Конвеєр відбору щороку забезпечує нові сорти та гібриди рослин для сільськогосподарського промислового виробництва, тим самим покращуючи якість продукції та маючи більш сильну стійкість до біологічних та абіотичних стресів.



Рис. 1.1 Селекція пшениці м'якої *Triticum aestivum* [1]

Основні досягнення в селекції призвели до «зеленої революції» у рослинництві. Диференціація та ідентифікація генотипів сільськогосподарських культур є важливою частиною селекції та виробництва насіння, а також важливим аспектом захисту авторських прав на сорти [1, 11]. В економічній ситуації, коли сорт має не тільки автора, а й товар із конкретним власником, необхідно створити надійний метод ідентифікації та реєстрації генотипів рослин.

Використовуються для цього маркери для генотипування та відмежування від інших генів. Маркерні або сигнальні гени [2] використовуються для визначення чітких ознак моделювання, які поєднуються із мінливістю інших

якісних чи кількісних ознак. Маркерами можуть бути фенотип і генотип. Фенотип включає морфологію та біохімію, а також генотип-молекулу. Для того, щоб перевірити відмінності між штатами, сортами та гібридами, існує багато ключових вимог до використовуваних маркерів [2].

Але в сучасних умовах часто використовуються для селекційних методів вирощування культур рослин найсучасніші молекулярно-генетичні підходи, а саме впровадження молекулярних маркерів для добору даних культур (Marker-Assisted Breeding, MAB or Marker-Assisted Selection, MAS).

Термін «Marker-Assisted Selection» вперше був використаний в літературі в 1986 р. для опису їх застосування. Перша основна стаття про використання MAS у селекції рослин з використанням маркерів ДНК була присвячена стійкості сої до нематод (*Heterodera glycines* Ichinohe) [3].

Принцип MAS полягає в наступному. Якщо місцезнаходження гена, що впливає на ефективність агрономічно важливих ознак відомо, то ознака контролюється не для його власних показників, а для успадкування гена, яка контролює ознаку, або існування бажаного алеля в селекційному матеріалі [4].

Необхідною передумовою будь-якої програми MAS є наявність молекулярних маркерів. Молекулярними маркерами можуть бути будь-які фрагменти ДНК, що використовуються для виявлення поліморфізмів і тісно генетично пов'язані з генами, що відповідають за аналізовані характеристики [5].

Основними типами поліморфізму ДНК є: 1) Поліморфізм довжини фрагмента рестрикції (RFLP). Причина – відмінність нуклеотидів у місці рестрикції; 2) мінісателіти. Причина полягає в тому, що кількість послідовностей нуклеотидів, що повторюються у тандемі, різна, і розмір послідовності повторень становить 10-100 нуклеотидів. 3) Мікросателіти (SSR), або прості тандемні повтори, або прості повторювані послідовності. Причина полягає в тому, що кількість тандемно повторюваних коротких послідовностей нуклеотидних ДНК різна, а довжина повторюваної послідовності становить від 1 до 6 нуклеотидів [4]. 4) Поліморфізм фрагмента ДНК з довільними праймерами (RAPD). Причиною є нуклеотидна різниця місця зв'язування праймерів. 5) Поліморфізм

ампліфікованої довжини фрагмента (AFLP). Причина – різниця в нуклеотидних між сайтом рестрикції та сайтом фланкування, б) Однонуклеотидний поліморфізм (SNP). Причина – заміна одного нуклеотиду в послідовності ДНК;

7) Поліморфізм експресованої послідовності (STS). Причиною є нуклеотидна різниця у вираженій послідовності. 8) Поліморфізм між ретротранспозонами (IRAP). Причина полягає в тому, що ретротранспозони включаються в нові частини генома [4].

Ці типи поліморфізмів ДНК не вичерпують сфери молекулярно-генетичних маркерів, і описи різних типів молекулярних маркерів можна знайти

в багатьох оглядах літератури [6]. Швидкий розвиток нових методів молекулярної біології, включаючи автоматизацію та комп'ютеризацію різних процесів, розробку відповідних статистичних методів для аналізу та програмного забезпечення та створення доступних баз даних для вивчення поліморфізму ДНК – все це сприяє використанню молекулярних маркерів більш активно в різних галузях базової та прикладної біології.

Останнє покоління молекулярних маркерів базується на прямому аналізі варіації послідовності в кожному зразку, а не на непрямому аналізі за допомогою зондів при аналізі RFLP або праймерів в аналізі полімеразної ланцюгової реакції (PCR) [4]. Однонуклеотидний поліморфізм (SNP) є найпоширенішим джерелом варіацій геному рослин і тварин. Прямий аналіз послідовностей – найнадійніша форма аналізу варіацій геному.

Отже, порівняно з попередніми поколіннями маркерів, використання маркерів SNP для аналізу має багато переваг, включаючи високу ймовірність виявлення маркера в цільовому гені через високу концентрацію SNP в геномі [7]. Хоча не всі SNP в даній селекційній популяції є поліморфними, висока концентрація цих маркерів збільшує ймовірність того, що принаймні один SNP буде поліморфним у цільовому гені або поблизу нього. Це дає SNP величезну перевагу над попередніми маркерами в генетичній програмі MAS. Ці маркери в кращому випадку тісно пов'язані з бажаним локусом (але не в самому локусі).

Коли маркер застосовується до інших популяцій з різними моделями рекомбінації, це з'єднання може легко загубитися.

Не менш важливою є простота автоматичного виявлення за допомогою маркерів SNP, тому пропускну здатність аналізу можна легко розширити до рівня, необхідного для селекційних програм [8]. Після широкомасштабного

секвенування його геному, маркери SNP генів-кандидатів, пов'язаних майже з усіма цільовими ознаками, незабаром будуть доступні у багатьох культурах [9].

Маркери для селекції рослин вперше стали популярними на початку 1980-х років, коли ізоферментні маркери використовувались для прискорення

проникнення моногенних ознак з чужорідної зародкової плазми.

Кілька років тому було описано перше використання маркерів на основі RFLP для поліпшення врожайності. Включаючи теоретичні питання, пов'язані із

маркер-опосередкованим беккросингом (marker-assisted backcrossing, MABC)

для поліпшення якостей. У 1990 р. було проведено перше теоретичне дослідження кількісних ознак MAS, що призвело до серії досліджень із використанням моделювання в 1990-х рр. [4].

Вже у 21 столітті проведено додаткові теоретичні обговорення щодо застосування MAS, у тому числі з оптимізації систем MABC та стратегій

пірамідкування необхідних алелів шляхом рекурентних схрещувань. Ці теоретичні дослідження зробили великий внесок у розуміння багатьох основних генетичних питань, що стосуються розробки MAS систем, таких як тип популяції, розмір вибірки, розмір геному, кількість та тип маркерів [10].

На даний час завдяки основному, технологічному прориву в галузі секвенування геномів вищих організмів добір цільових ознак може бути досягнутий за допомогою молекулярних маркерів, які тісно зчеплені з основними генами або які були розроблені з фактичної послідовності гена.

1.2 Шкодочинність збудників хвороб пшениці м'якої

Для великої кількості збудників грибних хвороб відомо, що їх здатність індукувати процес стійкості здатен проходити під звичайним менделівським контролем, але при цьому вірулентність, найчастіше, може успадковуватися

рецесивно [27]. Гени стійкості до грибних захворювань у пшениці здебільшого навпаки, домінують над генами сприйнятливості. За різних видів взаємодії цих генів можна роздивитися певні зміни менделівських співвідношень.

За відомою теорією «ген проти гена» сформувалась здатність визначати взаємні відносини між збудником і сільськогосподарською культурою на прикладі геометричних рядів без використання гібридологічного аналізу [58].

На сьогоднішній момент знання про механізми щодо захисту сільськогосподарських культур від грибних патогенів певних видів захворювань достатньо швидко збільшилась, особливо була звернута увага на рівні молекул.

Також серйозно збільшилась цифра розшифрованих генів стійкості до цих хвороб і були аналізовані певні інформації про регуляцію їх активності великою кількістю захисних процесів [59].

Було відзначено деякі розбіжності між різновидами культур пшениці м'якої за сполученням дефензинів, які є багатими на цистеїн білків з антимікробною дією, а також їх здатність індукувати збільшення етапу противірусного імунітету різними способами генетичної інженерії [60].

Важливим є також достатньо розповсюджений на сьогодні спосіб збільшення стійкості до патогенів захворювань і введення до гібридизації та трансгенезу приналежні культури рослин та дикорослих співродичів пшениці [60].



Рис. 1.2 *Aegilops tauchii*

Доповнені, замінені, інтрогресивні рекомбінантні лінії з невластивими їм генами стійкості до захворювань та маркерними особливостями (це повна відсутність воскової осуги, опушення листків, стеод, колосків, забарвлення основних вегетативних органів у пшениці та ін.) більшості видів пшениці м'якої (від *Ae. tauchi* (рис. 1.2), *T. timopheevii*, *Elytrigia sibiricus*, *Secale cereale*) є надзвичайно важливим вихідним продуктом для проведення селекційної роботи [61].

Здатність завдавати великих втрат урожаю пшениці як озимої так і ярої мають різні види грибних хвороб, серед них найбільш розповсюджені такі види захворювань, які проявляються у вигляді сажки або іржі, також може бути прояви гнилі кореневої системи, виявлятися симптоми борошнистої роси, септоріозу вегетативних органів, піренофороз, фузаріоз колоса та інші види небезпечних хвороб. Отже, культурні види пшениці потребують постійного контролю й захисту.

1.2.1 Бура листкова іржа (*Puccinia recondita* Roberge et Diem)

Захворювання розповсюджене у районах Лісостепової зони та на Поліссі, а в Степовій зоні лише при зрошенні та підвищеній вологості. Ця хвороба є найбільш небезпечною і шкідливою для злаків (рис. 1.3). Проявляється у вигляді бурх пустих на листках та їх піхві, які розташовані неупорядковано на листовій пластині [28]. Збудником цього небезпечного виду іржі є облигатний гриб-паразит *Puccinia recondita* Roberge et Diem / *sp. tritici* (Eriksson) C. O. Johnson зі складним циклом розвитку, статева стадія якого переходить на деякі види рутвиці (*Thalictrum*). Розвиток цього гриба в пшениці може відбуватися в широкому спектрі факторів навколишнього середовища [62].

Оптимальним для зараження та поширення хвороби є температура повітря 20 °С, коли для можливої інфекції достатньо 3 годин, а допустимі норми температури – 4-32 °С [63]. Інкубаційний період у випадку інфікування пшениці за умови, що температура 5-25 °С може тривати від 5 до 18 днів. Збудник цієї хвороби може зимувати в стадії уредніогрибниці на посівах озимої пшениці, а також деяких диких злаків. У період, коли збирають зернові та з'являються нові

паростки озимої пшениці, гриб *Rhizoctia recondita* зберігається у пшениці у вигляді уредніостадії [29].



Рис. 1.3 Буро-або листкова іржа [63]

Найбільшим центром утворення цього збудника в європейській частині колишнього Радянського Союзу був регіон Дагестан [31], а районами високого поширення бурої іржі серед злаків є країни Євразії та обох материків Америки.

Що стосується стійкості зернових, особливо пшениці до бурої іржі, то в переважній кількості подій спадковості класична взаємодія була встановлена як ген до гена. Поки вчені та селекціонери знайшли та ідентифікували понад 90 різних генів стійкості; для деяких із цих генів можуть існувати різноманітні алельні стани [32]. Однак відсоток рас бурої іржі, патогенних до певного гена резистентності, може зрости від менш ніж 5% до понад 60% всього-на-всього за декілька років [33]. Для визначення раси збудника бурої іржі зазвичай використовується серія ліній, отриманих від універсально сприйнятливого сорту Тетчер, які служать тестерами для встановлення генів резистентності. Вважають, що у середині 90-х років XX ст. відбулася суттєва зміна расового складу збудників бурої іржі на території України [62].

За словами вченого Пантелєєва В., в регіонах України та перспективних сортів злаків у 1988-1997 роках щороку з'являлися раси злакових – пшениці озимої 77, 192, 149, 62, 44 та х-раси [33]. Найефективнішими генами резистентності вважаються *Lr9*, *Lr19*, *Lr23* [34]. Гени *Lr24*, *Lr37*, *Lr34* з іншого боку є генами помірної стійкості. У цьому випадку носії гена неспецифічної резистентності характеризувалися високим рівнем сирійнятливості. Гени стійкості *Lr9* та *Lr19* були значно продуктивнішими в умовах центральних Лісостепових регіонів України [64]. У Київській області де раси 1 та 77 бурої іржі вважаються найпоширенішими, гени *Lr9*, *Lr24* та *Lr28* були більш ефективними

[65]. У виведенні культурних видів пшениці, особливо озимої прояв стійкості до хвороби часто є результатом віддаленої гібридизацією. Відповідно більшість знайдених генів стійкості можуть походити від більш чи менш споріднених із пшеницею видів. Тритікале та *T. durum* здатні поєднувати важливі сільськогосподарські властивості, стійкість до захворювань, і тому ці види є цінними для селекціонерів і можуть бути рекомендованими для виробництва. Селекційно-генетичний інститут НААН України отримав стабільні зразки м'якої пшениці отримані в результаті схрещування сортів локальної селекції з різноманітними представниками егілопсів, особливо з півдня України, а також деякі види з інтрогресованими ефективними генами *Lr* від *Ae. cylindrica*, *T. erebuni*, *T. dicoceoides* та *T. tauschii* [66].

1.2.2. Піренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis* Drechsler)

Сучасне небезпечне захворювання, яке вражає листя та пазухи листя пшениці, жита, ячменю, тритікале, пирію та інших злаків. Інша назва захворювання – жовта плямистість (рис. 1.4). Піренофороз вперше був зафіксований в середині ХХ століття в Канаді та США [61]. У нашій країні ця хвороба не мала широкого розповсюдження до початку 1990-х років, але останнім часом переважно в лісостепових районах можна зустріти цю небезпечну хворобу дедалі більше.

Піренофороз викликається паразитичним грибом *Pyrrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler. Втрати зернових від цієї хвороби становлять до 50%. Хвороба поширюється на інші злаки разом із зараженим насінням [35].



листова
форма хвороби



стеблова
форма хвороби



ураження зерна

Рис. 1.4 Симптоми піренофорозу [35]

Перші симптоми такого захворювання здатні проявлятися навесні на листках молодих культур, які були розміщені досить близько до поверхні ґрунту, у вигляді світло-коричневих круглих плям. Трохи пізніше ці плями забарвлюються в коричневий, а потім у темно-сірі, злегка витягнуті плями довжиною 0,5-2 см та шириною 2-4 мм [29]. Через деякий час ці плями зливаються, з формуванням великих некротичних утворень, які можуть займати іноді 1/2 площі листової пластинки, а можливо і більше [29]. Після цього листя починає передчасно в'янути і відмирати.

Статеве та вегетативне розмноження характерне для цього виду патогена. Навпроти мікро гриба такого виду захворювання як септорозу пікніди також здатні поширюватися повітрям на певну відстань, набагато довшу, ніж аскоспори [61]. Зараження таких культур, як пшениця, відбувається в розмірній температурній межі, але для росту необхідних спор потрібно, щоб листки були досить вологими у межах від 12 годин на чутливих видах пшениці і до 24 годин на середньо стійких культурах [67]. Інкубаційний розвиток піренофорозу при температурі від 20 до 25 °C становить 3 - 4 дні [29], а через тиждень може

спостерігається таке явище, як спороншення збудника в місці ураження. Але найефективніший розвиток збудника проявляється на вже старих листках і листових пластинах злаків.

Сьогодні коло поширення цього небезпечного захворювання дуже широке.

Це різні регіони, включаючи обох материків Америки, Індії, Пакистану, Австралії, Угорщини, Чехії, західних регіонів Росії. Однак масштабне розповсюдження піренофорозу або жовтої плямистості в країнах Європи та Азії відбулося лише в останні десятиліття.

Джерелом зараження можуть бути заражені рослинні залишки, на яких збудник може зберігатися в сумчастому стадії.

Генетики виявили досить незвичні взаємовідносини між специфічними продуктами життєдіяльності збудника та клітинами пшениці, що може виявлятися в омертвінній тканині листя, а деколи навіть хлорозі [68]. Чітко було

визначено, що симптоми жовтої плямистості викликається токсинами, які продукують збудник *P. tritici-repentis*. Прояв чутливості до дії таких небезпечних токсинів може бути пов'язаний із сприйнятливістю до захворювання. Знайдено специфічні гени стійкості до піренофорозу, їх можна поділити на класи за токсинами збудника, нечутливості до яких забезпечує той чи інший ген: токсину

$P_{tr} ToxA$ що спричиняє некроз (резистентні гени tsn), токсинів $P_{tr} ToxB$ та $P_{tr} ToxC$ що спричиняють хлороз (гени стійкості tso). Окрім цього виділяють окрему групу генів стійкості до піренофорозу, tsg специфічність яких до кінця не

з'ясована [36]. Гени чутливості у всі названих випадках є рецесивними тоді як гени чутливості відповідно домінантними [62]. Було достатньо проаналізовано, що $P_{tr} ToxA$ і $P_{tr} ToxB$ токсини є білками, а $P_{tr} ToxC$ - пептидом невеликої молекулярної маси [37].

Один з докладно аналізованих токсинів, який є досить характерним для рас 1, 2, 7 і 8 піренофорозу це $P_{tr} ToxA$ [69], представляє собою білкову

структуру з невеликою молекулярною масою, яка дорівнює 13,2 кДа, він здатний призводити до появи небезпечних некрозів у чутливих сортах пшениці при безпосередній їхній обробці [70]. Функціональний $P_{tr} ToxA$ - представлений у

вигляді білкової структури довжиною 117 амінокислотних залишків та вторинною структурою, стабілізованою дисульфідним зв'язком, обов'язковими працюючими факторами є певні ділянки, що містять деякі амінокислоти, такі як

аргінін, гліцин та аспарагінова кислота. Ще було відмічено, що цей небезпечний токсин може існувати як димер. Токсин *A. P. tritici-repentis* здатен діяти на самі клітини рослинних мезофілів, особливо проявляє свою дію на пластоціанін та білок зелених пігментів ТохАВР1, що змінює шлях транспорту електронів у фотосистемі II, і в результаті самого етапу проникнення токсину в клітину клітинна стінка рослини не руйнується [71].

Расовий склад ізолятів збудника *P. tritici-repentis*, зібраний у різних регіонах, включаючи Північну Америку, Південну Америку та Європу, майже не відрізнявся залежно від уражених злаків, що також свідчить на користь

порівняно недавнього поширення піренофорозу, а також вказує на переміщенням насіння як джерело інфекції на всіх континентах. Навпаки, російські генетики проаналізували суттєві відмінності расового складу збудника між популяціями з північно-західного та південно-західного штатів [72]. У ньому більше домінувала раса 1. Вона також переважала серед ізолятів, зібраних у Чехії, хоча було достатньо знахідок і раніше невідомих рас (до 25%) [38]. Дані

про расовий склад збудника піренофорозу в Україні обмежені. ○○

З-поміж сучасних сортів пшениці стійкість (нечутливість) до *P. tritici-repentis* є достатньо поширеною [73]. На підставі результатів дослідження м'яких

та озимих сортів пшениці, які є достатньо розповсюдженими культурами в Канаді з 1870 року щодо стійкості до токсинів А і В збудника жовтої плямистості, було встановлено, що їхня доступність залежить від батьківських форм, які використовують у той чи інший час [74]. Зменшення генетичного різноманіття нових сортів несе певну небезпеку зростання шкоди врожаю від піренофорозу.

Важливим осередком стійкості до збудника цієї нелегкої хвороби є споріднені культури, зокрема *Ae. tauschii* Coss [38]. Серед усіх екземплярів пшениці роду *Aegilops* із колекції Всеросійського інституту рослинництва М. І. Вавилов найбільшу ефективну стійкість до жовтої плямистості відзначали такі

види, які містять ген Д – це такі культури пшениці, як *Ae. causchii* та *Ae. cylindrica*. Може успішно передаватися стійкість від *T. timopheevii* [39]. Серед знайомих нам зразків пшениці відсоток стійких культур був найбільшим у *T. monosocum* та *T. timopheevii* [75]. У Державному інституті рослинництва В.

Юр'єва НААН з високою ефективністю стійкості змогли відрізнити декілька весняних сортів від Мексики, виявлені віддаленою гібридизацією з *Ae. squarrosa*, а також ряд зимових екземплярів з України, Угорщини, Румунії та Росії. У цьому випадку маса тисячі зерен і повнота такого насіння корелювалися зі стійкістю [40].

Враховуючи провідну думку вчених щодо мінімальних витрат на обробку землі та в цілому подальшу спеціалізацію держави для виробництва насіння та світові напрями розповсюдження цього небезпечного захворювання, потрібно обов'язково проводити власні державні програми щодо висадки сільськогосподарських культур, які мають стійкість до піренофорозу.

1.2.3. Фузаріоз колоса (*Fusarium graminearum*)

Це захворювання розповсюджене, де вирощують злакові культури (рис. 1.5). Воно проявляється у фазі колосіння зерна. У вогі роки з легким температурним режимом фузаріоз інтенсивно розвивається і в другій половині вегетаційного року, особливо при затримуванні строків дозрівання злакових культур. Уражується колос, колосові лусочки, зерно. Симптоми даної хвороби на зернових культурах може різнитися залежно від патогена захворювання.

Збудниками даного захворювання є мітоспорові гриби із роду *Fusarium*: *F. culmorum* (Sm.) Sacc, *F. sporotrichiella* Bilai var. *poete* (Peck.) Bilai, *F. sporotrichiella* var. *tricinctum* (Corda) Bilai, *F. poae/sporotrichoides* (Peck.) W., *F. subglutinans* (Wolentz. et Reinking), *F. semitectum* (Berk. et Rav.) Bilai та ін. [29]. Вони відрізняються наявністю або відсутністю різних видів спор мікроконідій, хламідіоспор тощо.

Фузаріоз може з'являтися під виглядом рожевого нальоту на колосі, в лусочках утворюються блідо-рожеві або оранжеві подушечки, які при злитті

утворюють некротичні плями або суцільний наліт грибниці патогена. Іноді такі утворення можуть формуватися ззовні зерна [29].

У спекотну погоду захворювання може легко аналізуватися тим, що заражені зернята, частини колоса або суцільний колос стає білого кольору, а здорові частини рослини зберігають зелений колір. При настанні вогкої погоди на заражених частинах колоса утворюються малі чорненькі з синім відтінком плями – перитещі збудників фузаріозу або зерна в колосі стають сухими, поступово чорніють в результаті утворення темнуватого нальоту напівсапрофітних та сапрофітних грибів [29].



Рис. 1.5 Фузаріоз колоса [44]

В заражених культурах спостерігається пухле колосся. *F. sporotrichiella* var. *roae* не викликає занадто видимих симптомів хвороби на колосі [29]. В ураженому збудником зерні западається токсин Т-2, який може спричинити гостре отруєння у людей і тварин.

Характерним проявом ураження колосових культур *F. sporotrichoides* var. *tricinctum* є наявність на колосі вічкової плямистості і темно-фіолетового кольору лусочок. Збудник *F. roae* може викликати на лусочках колосся довгуваті рядкі штрихи або темні плямистості. При зараженні злакових культур у фазу цвітіння зернятка в колосі стають блідо-зеленого забарвлення, часто покриті блідо-рожевим нальотом [29].

Розвиток хвороби на колосі після цвітіння рослин здатні викликати сухість зерна, воно стає світло-зелено-сірого забарвлення. Деколи на самій поверхні зерна утворюються рожево-червоні крапки. Занесення інфекції на колосся перед збиранням урожаю може призвести до прихованої інфекції, коли зернятка в колосках на вигляд бувають здоровими, але при мікроскопії в його ендоспермі з'являється грибниця збудників. Зерна набувають рожевого кольору, стають сухуватими, втрачають яскравість. Під час вегетації збудники фузаріозу розповсюджуються за допомогою конідій [29].

Розвитку даного захворювання слугує висока вологість повітря (понад 70%), яка може тривати протягом 24-40 годин, щоденні дощі та температура повітря вище $\pm 20^{\circ}\text{C}$ [29]. За низької температури розповсюдження даної інфекції в польових умовах не створюється. Критичною позначкою для зараження є фаза цвітіння. Багатий на поживні речовини пилок сприяє швидкому проростанню конідій і сумкоспор грибів.

Збудники хвороби здатні шкодити зерну мікотоксинами, створюючи його непридатним і навіть шкідливим для вживання в їжу або на корм тваринам. Основний осередок інфекції – це заражені рештки і зерно. Конідії і сумкоспори патогенів можуть бути життєздатними протягом одного року, хламідоспори й склероції – до 2-3 років [29].

У прояв резистентності до цієї небезпечної хвороби до теперішнього дня відносно мало вивчені та проаналізовані. Так, згідно з проведеними експериментами Н. W. Schroeder та J. J. Christensen (1963) було детально вивчено такі особливі типи стійкості до фузаріозу колосу. Перший тип стосується резистентності до первинної інфекції, а другий тип зображає імунітет до поширення патогена хвороби по рослині [41].

Переважаюча кількість сьогоденних праць вчених містять і інші типи стійкості до фузаріозу колоса: це і резистентність до зараження насіння пшениці (третій тип), а також витривалість до цієї хвороби та трихотеценів (четвертий тип) [41]. До п'ятого сучасного типу можна віднести резистентність до акумуляції трихотеценів. Стійкість останнього типу може створюватися

огоченням накопичених трихотенів як процесом індукції метаболізму токсичних речовин, так і процесом інгібування біосинтезу рибних токсичних речовин.

Резистентність до цього небезпечного захворювання є полігенною ознакою. Великі масштаби зараження посівів злакових в Україні в останні роки привертають серйозну увагу на необхідність утворення ліній та гібридів з високими рівнями стійкості до фузаріозу. Було вивчено понад 100 QTL (Quantitative Trait Loci – локуси кількісних ознак) стійкості гексаплоїдної пшениці до збудника захворювання, 22 з них мають множинний алелізм [41].

1.3 Молекулярні маркери як один з елементів біотехнології

Застосування молекулярних маркерів ще не зустріло таких проблем, як генетично модифіковані рослини. Перш за все, біохімічні білкові маркери почали широко використовуватися в цей час, щоб визначити їх основні сфери застосування – генетику та селекцію рослин [42]. Білкові маркери зазвичай відносяться до молекулярних, оскільки білки є молекулами. Білкові і ДНК-маркери мають спільні риси, але їх відрізняє те, що ДНК-маркери дозволяють безпосередньо отримати інформацію про особливості генотипу, в той час як в більшості випадків при використанні білкових маркерів необхідно застосовувати методи генетичного аналізу.

Білкові і ДНК-маркери доповнюють арсенал методів аналізу генома рослин. Найбільше поширення ДНК-технології отримали після впровадження ПЛР-аналізу, який дозволив широко досліджувати молекулярно-генетичний поліморфізм. Характеристиками ПЛР-аналізу є: можливість роботи з невеликою наважкою зразків, незалежно від стадій розвитку рослин, що охоплюють майже весь геном, здатність створювати необмежену кількість маркерів, здатність обробляти будь-які тканини рослин, здатність автоматизувати проліферацію ДНК, можливість одночасно аналізувати великі вибірки та швидкість отримання результатів за наявності програм для обробки комп'ютерних даних [42].

Молекулярні маркери для ПЛР-аналізу повинні відповідати наступним вимогам: високий поліморфізм і високий рівень генетичної гетерозиготності;

послідовність мішені повинна бути легко спеціально ампліфікована; метод виявлення алельних варіацій повинен бути простим і надійним; необхідна популяція для частоти дані генотипу для оцінки дискримінаційної сили маркера

та можливості помилкового збігу; систему маркерів необхідно незалежно успадкувати, щоб частоту, отриману від однієї системи, можна було помножити на частоту, отриману з інших систем маркерів, збільшуючи тим самим дискримінаційну потужність лексеми.

Незалежне успадкування відбувається, коли маркери розташовані в різних хромосомах чи у рівнозначному зчепленні в одній хромосомі. З 1992 р.

Південний біотехнологічний центр УААН почав розробку методів визначення молекулярно-генетичних поліморфізмів сільськогосподарських рослин за допомогою ПЛР-аналізу вперше в країнах СНД [43]. За цей період були виявлені

системи маркерів ПЛР, які можуть вирішити багато проблем у генетиці та селекції рослин. Молекулярні маркери поділяються на дві групи: кодомінантні – одинично локалізовані, множинні алелі, домінантні – множинні локуси, біалельні.

Найпоширеніші кодомінантні маркери – це мікросателіти, що використовуються в аналізі SSR. Кодомінантні маркери використовуються для

ідентифікації та реєстрації сорту, визначення генетичної чистоти та типовості штаблів, сортів, гібридів, лабораторної ідентифікації посівів, протих та кількісних ознак тощо. Система полілокусів (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP)

дозволяє вивчати велику кількість локусів, які представляють усі частини геному в порівняльному аналізі [43]. Завдяки цим характеристикам для визначення

генетичної кореляції, відновлення родоводу, визначення ідентичності зразків, маркування агрономічних ознак тощо було використано домінуючу багатосайтову систему молекулярних маркерів.

В селекційному процесі значне місце відводиться характеристиці

вихідного матеріалу. Колекційні розсадники досить часто містять отримані різними шляхами і з різних джерел зразки, які потребують поглибленого вивчення. В практиці вітчизняної селекції відомі випадки, коли лінії кукурудзи

американського походження розповсюджувались під назвою ВР44, ВР 38, ВР 40, ВР 43 та інші. Близькі генотипи одного походження мали різні назви (Білоцерківська 198 і Миронівська 264). Вперше, згідно з процедурою UPGMA,

для розподілу породи на основі генетичної кореляції використовуються довільні маркери RAPD та розподіл кластерів [43]. Дендрограма заснована на аналізі ПЛР, надає інформацію про генетичний зв'язок між досліджуваними зразками, що дає можливість виключити близькі або однакові форми з програми розведення.

Система розподілу кластерів NJ-Tree (метод найближчого сусіда) надає дані про можливі джерела генотипів. Маркери RAPD представляють усі частини геному і дають інформацію про мінливість не однієї області, а значної частини геному, що важливо для визначення генетичних зв'язків у порівняльному аналізі [43]. Деякі частини геному мають різну швидкість розбіжності та еволюції. Тому

для порівняння видів чи сортів важлива інтегральна карта мінливості генетичного матеріалу. Водночас це зручна система, яка не потребує даних.

RAPD не завжди дозволяє отримати відтворювані дані між різними лабораторіями. Це може перешкоджати порівнянню даних, отриманих за різних умов. Наступною розроблена система ISSR-аналізу з більш строгим критерієм

реакції, яка дозволяла отримати дані, що могли бути відтворені в умовах різних лабораторій. Прогрес досліджень організації геномів дає змогу розробити нові багатолокусні маркери на основі змінної частини ретротранспозонів [43]. У

багатьох видів рослин ретротранспозони складають більше 50 % геному і є повторюваними частинами, і їх дослідження, як очікується, будуть використані в генетичному розведенні. На основі області LTR-ретротранспозону були створені маркери IRAP, і був досягнутий значний прогрес у визначенні молекулярно-генетичних поліморфізмів. Найефективнішою системою ПЛР-аналізу на багатьох сайтах є REMAP, яка використовує ретротранспозонні

мікросателіти (табл. 1). Згідно з аналізом REMAP, сорти ячменю поділяються на ярі та озимі, шість рядів та два ряди [44].

НУБІП України

Таблиця 1
Порівняльна характеристика IRAP REMAP ПЛР-аналізу ячменю [55]

Назва методу	Кількість (пар) праймерів	Кількість ПЛР-локусів	Кількість поліморфних ПЛР-локусів	Рівень поліморфізму (%)
IRAP	9	143	84	58,7
REMAP	9	156	105	67,4

Для визначення генетичної однорідності сорту, типовості лінії та ідентифікації сорту використовуються мікросателітні маркери або SSR маркери.

Визначення сорту відповідно до вимог UPOV (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants - Міжнародний союз з охорони нових сортів рослин) проводиться на основі морфології згідно тесту DUS. У США та кількох інших країнах, як доповнення, були введені методи ідентифікації за допомогою молекулярних та білкових маркерів [43]. На показники фенотипічних ознак

впливають умови зростання, що ускладнює диференціацію та ідентифікацію сортів, особливо за тісно пов'язаних умов. Морфологічна ідентифікація сорту вимагає від двох до трьох років польового спостереження.

Через обмежене представлення генів, що їх кодують, білкові маркери не завжди розрізняють генотипи (різноманітність, штами). Найефективнішим методом генотипування є використання мікросателітів для ПЛР-аналізу. Мікросателітний локус – це спіральна домінантна тандемна змінна-кількості повторів нуклеотидної послідовності ДНК [43]. Вони є одночастинними та багатоалельними, що дозволяє розробляти системи для ідентифікації генотипів за алельним статусом. Аналіз молекулярно-генетичних поліморфізмів шляхом визначення алельного стану мікросателітних локусів є основою для диференціації та реєстрації сорту. Південний біотехнологічний центр УААН розробив метод реєстрації важливих сортів сільськогосподарських рослин, штамів та гібридів шляхом типізації ДНК. ПБЦ та Національна служба захисту прав на сорти рослин України опублікували науково-методичний посібник для ідентифікації та реєстрації сортів за допомогою ДНК-типізації [43].

За молекулярними маркерами встановлюється не тільки однотипність сорту, а й алельний стан окремих агрономічно важливих генів. Так, в ПБЦ О. Стратулою було розроблена технологія визначення алельного стану гена β -амілаз, який пов'язаний з пивоварними якостями ячменю [45]. І. Петровою запроваджений аналіз алельного стану гена Wx в популяції пшениці, який дозволяє до колосіння і до утворення зерна визначити генотип і сприяє добору тільки необхідних алельних станів рослин для гібридизації [46]. Це значно скорочує термін і масштаби селекційної роботи.

Сучасні біотехнології створили нові методи вдосконалення рослин, які можуть підвищити ефективність традиційного розведення. Але проблема в необхідності спільних селекційних та біотехнологічних програм та їх фінансування існує і на сьогодні.

1.4 Впровадження молекулярних маркерів для селекційного відбору пшениці м'якої

М'яка пшениця (*Triticum aestivum* L.) – однорічна, озима або яра трав'яниста рослина з мичкуватою кореневою системою, яка проникає у ґрунт на глибину 1-1,5 м і більше (рис. 1.6). У подальшому на її розвиток більше вплинула селекція, спрямована на поліпшення показників, потрібних людині.

Багаторічна селекція перетворила пшеницю на вид із низькою генетичною різноманітністю порівняно з її дикими предками. Генотипи диких злаків часто несуть гени стійкості до біотичних, абіотичних чинників і є джерелом для розширення генетичного різноманіття м'якої пшениці [12].



Рис. 1.6 Пшениця м'яка, сорт Сотня, Харків [12]

Екологічна пластичність забезпечує можливість вирощування сортів пшениці на великих територіях різних кліматичних зон. Однак їх генетична одноманітність призводить до зниження врожаю через пошкодження новими расами патогенів. З метою підвищення стійкості пшениці та розширення її генетичного різноманіття застосовується для введення генів, що контролюють економічні ознаки, в генотипи пшениці диких зерен такі селекційні методи як міжвидова гібридизація [12, 13] та методами генетичної трансформації [14].

Світова тенденція у програмах з генетичного поліпшення пшениці нині пов'язана із застосуванням інтрогресивної гібридизації, простих парних і бекросних схрещувань. Як правило, використовуючи традиційні та нові генетичні, молекулярно-генетичні методи можуть значно розширити генотип пшениці, створюючи нові сорти, стійкі до біотичних та абіотичних стресів навколишнього середовища та покращені якості.

На сьогодні перспективною ознакою для впровадження пшениці м'якої в селекційну роботу є в першу чергу наявність стійкості до різних збудників захворювань та шкідників. Велика кількість аграрних наукових структур працюють над створенням більш стійких сортів та ліній цієї сільськогосподарської культури від різних захворювань, насамперед на сьогодні стоїть гостро питання щодо знайдення стійких сортів та ліній до збудників таких хвороб як піренофороз (це досить новий вид захворювання, який до початку XXI століття не мав широкомасштабної дії на території нашої держави), борошниста роса, септоріоз та бура іржа [15].

❖ **Борошниста роса.** Збудником захворювання є гриби, які належать до класу *Ascomycetes*, порядку *Erysiphales*. Проявляються переважно на молодих, активно вегетуючих рослинах. Шкодливість її полягає в зменшенні асиміляційної поверхні листя, що уповільнює розвиток рослин.

Хвороба призводить до зменшення кількості й маси зерен у колосі та неповного наливу зерна. Недобір урожаю внаслідок ураження борошнистою роскою становить 10-15 %, а в епіфітотійні роки – і до 30 % [15].

❖ **Бура іржа** (збудник – дводомний гриб *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm. (*P. triticina* Erikss)). Найбільшої шкоди завдає у фазі молочної стиглості рослин. Шкодочинність її полягає в зменшенні асиміляційної

поверхні та посиленні транспірації рослин, що призводить до порушення водного балансу й передчасного відмирання листя та утворення плоского зерна. Втрати врожаю за ступеня ураження до 40 % становлять 3-4 ц/га, а понад 40 % – перевищують 10 ц/га [15].

❖ Шкодочинність **септоріозу** (збудник *Septoria tritici* Rob. et Desm., *Septoria graminum* Desm., *Septoria triticola* Lobik.) проявляється у зменшенні асиміляційної поверхні листя, недорозвиненості колосків, плоскості зерна, зниженні врожаю та сходів насіння. В Україні септоріоз поширений майже повсюдно, особливо в роки з підвищеною зволоженістю. Високої інтенсивності він набуває за умов тривалої вологої та вітряної погоди, надмірних опадів, особливо в період цвітіння-колосіння. Недобір урожаю від нього може сягати понад 20 % [15].

Інститут захисту рослин НААН України, особливо така лабораторія як екологічної генетики рослин та біотехнології в даний момент розглядає проблему поширення цих видів захворювань та збирає зразки пшениці м'якої з різних куточків України і перевіряє наявність генів стійкості у сортах та лініях сільськогосподарської культури для подальшого впровадження їх в селекційну роботу. Протягом 2019-2020 рр. а також першої половини 2021 року разом з такими науковими інститутами як Миронівський інститут пшениці імені В.М.

Ремесла та Інститутом фізіології рослин та генетики НАН України (ІФРiГ) було проаналізовано більше 200 сортів пшениці м'якої [70].

За результатами проведеними лабораторією було встановлено, що миронівські сорти пшениці м'якої української селекції є стійкими до фузаріозу колоса і тому можуть впевнено вирощуватись селекціонерами та мати гарний врожай. Сорти відібрані з колекції ІФРiГ переважно мали стійкість до ще одного збудника такого небезпечного захворювання як стеблова іржа (для роботи був

використаний молекулярний маркер *Sr33* та *Sr39*) і всім відомо бура іржа (молекулярний маркер – *Lr34*) [70].

Також у 2019 році спільно з Полтавською державною аграрною академією було проаналізовано 18 полтавських сортів (деякі з них – Оржиця, Левада, Кармелюк, Радивонівка та інші), їхні результати були оптимістичні, тому що в деяких сортах було виявлено стійкість до збудника такого нового виду захворювання як піренофороз з використанням молекулярного маркера *X/cr023* [71].

Також не менш важливим і цінним об'єктом для дослідження в селекційній роботі є сорти та лінії пшениці м'якої з пшенично-житніми транслокаціями 1BL.1RS та 1AL.1RS [16]. Сорти пшениці з транслокацією 1BL.1RS зазвичай містять гени, що контролюють стійкість до таких ґрунтових патогенів, як бура іржа (*Lr26*), стеблова іржа (*Sr31*), жовта іржа (*Yr9*), борошниста роса (*Pm8*) [17] та інші гени стійкості до хвороб та шкідників (рис 1.7, 1.8).



Рис. 1.7 Стеблова іржа



Рис. 1.8 Борошниста роса

У 2011 році близько 1050 сортів мали 1BL.1RS, деє біля 100 сортів мали таку транслокацію як 1AL.1RS і близько 30 сортів мали транслокації 1R (1B) [18]. На основі досліджень, проведених в Інституті рослинництва Юр'єва НААН

України в 1998 році, було ідентифіковано у с/г культурі пшениці 68 іноземних транслокацій з генами стійкості до хвороб та комах та іншими цінними адаптивними характеристиками.

Найпоширенішими були такі транслокації 1BL.1RS – 312 зразків, 1AL.1RS – 13 зразків, 2BS.2RL та 6BS.6RL – по одному зразку [19]. Більшість вітчизняних сортів із транслокацією пшениці-жита 1BL.1RS походять від відомих сортів

озимої м'якої пшениці Кавказ та Аврора [19], які були отримані шляхом включення до гібридизації однієї з форм пшениці м'якої, отриманої від схрещування пшениці з житом. У 1972 році був створений кавказький сорт

пшениці м'якої вченим П. П. Лук'яненком був використаний для заміни лінії 1R (1B) як одного з компонентів перетину пшенично-житньої лінії Neuzucht 14/14 і

був заключений у родовід сортів пшениці у багатьох країнах світу. Отже, аналіз 46 вітчизняних м'яких сортів озимої пшениці першого та четвертого поколінь виявив, що 22 сорти мають пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS та 4 сорти - 1AL.1RS-транслокацію [15].

Економічна цінність м'яких сортів пшениці з транслокаціями 1BL.1RS та 1AL.1RS зумовлена їх позитивним впливом на стійкість рослин до численних захворювань, абіотичного стресу та врожайності, які пов'язані з коротким плечем житньої хромосоми 1R [16].

Гени стійкості розташовані на короткому плечі 1RS житньої хромосоми наступним чином: центромера-*Sec-1-Lr26 / Sr31 / Yr9*-теломера [20]. Завдяки існуванню генів стійкості до біотипів попелиць (*Gb2, Gb6*), борошнистої роси (*Pm17*) та кліщів, транслокація 1AL.1RS була поширена серед комерційних видів [21].

Рослини пшениці з транслокацією жита є більш посухостійкими, більш пристосованими, мають більший урожай і мають більший урожай і мають

більший вміст білка в зернах. Ефективність гена короткого плеча жита 1RS залежить від генотипу сорту пшениці [21].

У 2015 році в журналі «Фактори експериментальної еволюції організмів»

було опубліковано статтю Чеботар про використання молекулярних маркерів для визначення якісних ознак у пшениці м'якої на основі сортів та ліній цієї с/г культури, взятих з Південного біотехнологічного центру в рослинництві [22].

Згідно з викладеним матеріалом, можна підкреслити важливість таких якісних ознак у пшениці м'якої. Їх дослідження вперше виявило алельні характеристики

генів, які контролюють якість зерна м'якої пшениці це так звана твердість /

м'якість та низький вміст амілози в генотипах сортів та ліній пшениці м'якої української селекції [23]. Алелі *Pina-D1a/b* та *Pinb-Da/b* були ідентифіковані в

багатьох українських сортах за допомогою маркера для пуринових генів *a* та *b*,

які контролюють якість зерна, м'якості чи твердості пшениці. Сорти Мирлебен,

Оксана, Миронівська 33 відносяться до рослин з м'якими зернами (*Pina-D1a*;

Pinb-D1a); результати показують, що велика кількість українських сортів (95%)

мають алелі *a*, а отже вони мають тверду частину зерна, але їх індекс фізичної твердості сильно коливається – від 51,0 до 88,4 ум. од. [23]

Також в цьому центрі, алельний статус *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* та *Glu-A3*

локусів у 14 сортах та 6 майже ізогенних м'яких лініях пшениці було визначено методом ПЛР-аналізу, що були отримані з сорту Безоста 1, яка відрізняється за локусом гліадину [24]. Було отримано спроможність розрізняти методом

полімеразно-ланцюгової реакції генотипів даної с/г культури, що належать до

різних груп, за алельними варіантами блоку гліадину [24].

В цілому визначено нижчий рівень генетичного поліморфізму за допомогою алель-специфічної ПЛР з праймерами, запропонованими Zhang et al.

[25], у порівнянні з усім комплексом генетичного поліморфізму, що визначається

електрофорезом запасних білків.

Особливого значення для встановлення та регуляції шляхів збудників захворювань злакових культур має такий ген як «відсутність процесу експресії пов'язаних із збудником протеїнів першої групи» (non expressor of pathogenesis-

related proteins 1, *NPR1*). Для помірно стійких до фузаріозу колоса європейських генотипів пшениці Саро та SVP720V7 було проведено в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України дослідження взаємодії рослин із грибами видів

F. graminearum та *F. culmorum* на рівні експресії [26]. Було ідентифіковано

певний зв'язок алельних станів двох подібних до *NPR1* гомологічних генів

TDF-076-2D і *TDF-076-2A* на хромосомах 2D і 2A пшениці зі стійкістю за типом

II на рівні 14,2 % та 3 % відповідно, та алельні стани цих генів, що відповідають

стійкості й чутливості до збудників фузаріозу колоса. Локалізували молекулярні

маркери, характерні для цих алельних станів [26].

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт дослідження

2.1.1. Загальна характеристика пшениці як модельного організму

Цей вид пшениці є найбільш поширеним у Євразії, а також на обох материках Америки за площами посівів (рис. 2.1). За таксономією ця сільськогосподарська культура відноситься до класу Однодольних (*Liliopsida*), порядку Тонконогові (*Poales*), родини Тонконогові (*Poaceae*).

Коренева система у цього виду пшениці розгалужена мичкуватого типу.

Рівень росту коренів у пшениці може залежати від деяких факторів, як вологість ґрунту (найбільш сприйнятливий проміжок вологості – 60-70 %), температура поверхні землі, а також застосування різних видів добрив (азотних, калійних) [59].



Рис. 2.1 Пшениця м'яка

Стебло у пшениці видовжене, має вигляд соломинки і свій ріст починає із проростання у асінини. Ця соломинка має від чотирьох до семи міжвузлів, які розділяються стебловими вузликами. Висота стебла у пшениці м'якої також залежить від різних біологічних та фізичних чинників. Суцвіття у даного виду зернової культури – це складний колос. Він має головний стрижень і розгалужених колосків із зернами, сумарна кількість яких може коливатися від дванадцяти до двадцяти двох колосків [47].

Сьогодніне вирощування м'якої пшениці, яка була утворена за рахунок багатьох схрещувань дикорослих і культурних сортів злакових, генетичних мутацій, селекціонування, здатна тривати вже більше 10000 років, яку і здатна практикувати сьогоднішня людина.

Серйозні зміни в генетиці пшениці були досліджені в 50-х рр. ХХ століття у результаті схрещування з сортом Norin 10, у якого стебло коротке і який був виведений у Японії. Результатом цього стало те, що з дикої рослини висота якої становить 1,2 м, з дрібними зернами пшениці, була утворена висотою приблизно 40 см, з у чотири рази більших колосках і більших зернах,

які легко вимолочуються [47]. На сьогоднішній день пшениця може дати у 10 разів більш гарні врожаї, ніж в попередні часи, культивується тисячі сортів.

Застосовується дана пшениця для виготовлення високоякісного борошна, різних видів круп (манної і перлової). Також її використовують як основний вид корму для сільського господарства, а в тваринництві ще можна використовувати солону та висівки.

В Україні пшениця вважається однією з основних продовольчих культур. З нього роблять цінний культовий для українців хліб, тому економічну цінність зерна важко недооцінити. Якість випеченого продукту визначає склад зерна. Серед інших зерен озима пшениця має найвищий вміст білка, який може досягати 15% залежно від технології виробництва та сорту [48]. Крім того, зерно також багате вуглеводами та іншими важливими мікроелементами.

Існує багато відмінностей між сортами твердої пшениці та м'якими сортами пшениці, включаючи значні переваги, особливо врожайність. Характеристики сорту забезпечують стабільну культурну рослинність. Тверда пшениця більш толерантна до навколишнього середовища - шкідники і хвороби менше уражаються посівами [48]. Рослини виявляють сильну

стійкість до вилягання, і зерна не будуть ламатися. За стабільних умов росту тверді сорти демонструють значний урожай. Цей вид пшениці популярний у

всіх галузях харчової промисловості: хлібопекарській, борошняній та зерновій, цукерках, макаронах тощо [48].

Озима пшениця на м'яких сортових культурах має тонкі стебла. Верно склоподібне і борошнисте. Його колір може бути білим і темно-коричневим.

Борошно пухке. З нього виробляють хлібобулочні та кондитерські вироби.

2.1.2. Гени стійкості до грибних хвороб у пшениці м'якої

Для кожної хвороби, яка здатна вражати пшеницю та її види генетиками були знайдені гени стійкості, які перешкоджають прояву певного виду небезпечного захворювання.

Серед відомих генів стійкості до бурої іржі найефективнішим та перспективним геном вважається. Він забезпечує видо-неспецифічну резистентність до цієї хвороби і зазвичай зберігає свою ефективність

упродовж багатьох сезонів. Дослідниками з Інституту захисту рослин, а саме

лабораторії екологічної генетики рослин та біотехнології підтвердили, що цей

ген стійкості у пшениці може бути представлений двома алелями: *Lr34(+)* – алель, що робить сорти пшениці стійкими до бурої іржі; *Lr34(-)* – алель, який присутній у «чутливих» сортах.

Для виявлення максимальної кількості поліморфних ділянок між

названими алелями гену доцільно застосовувати комбінацію маркерів *caISBP1* та *caSNP12* [41, 57]. Ця комбінація спрямована на зокрема на поліморфізм у 10-му екзоні гена-кандидата та наступному за ним інтроні для того, щоб

напевно виявити його алельний стан під час проведення мультиплексної

полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

В Інституті харчової біотехнології та геноміки НАН України було проведено аналіз 80 сортів пшениці української селекції на одночасне виявлення двох типів алелів гена стійкості до бурої іржі, і тільки три сорти із усіх представлених для аналізу виявили позитивний результат.

До захворювання твердої сажки генетиками було знайдено 10 генів стійкості. Для знайдення місця на молекулярній генетичній карті хромосоми 6L пшениці гена стійкості до дії цього захворювання було досліджено деяку

вибірку сортів пшениці за допомогою молекулярних маркерів, що змогли знайти явище поліморфізму в даній вибірці (рис. 2.2). Для аналізу було взято такі молекулярні маркери, як *Xgwm 33-1BS*, *Xgwm 18-1BS*, *Xgwm 131-1BL*, *Xgwm 259-1BL* [49].

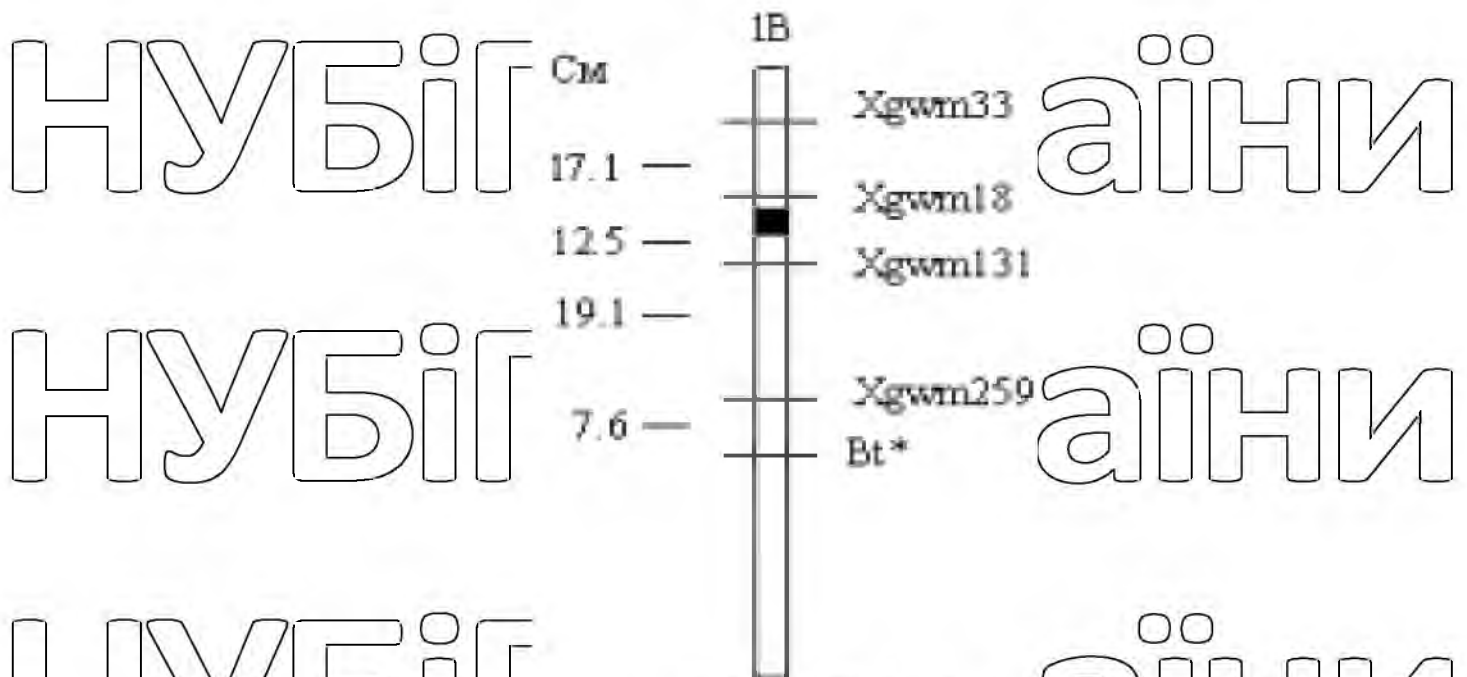


Рис. 2.2 Генетична карта хромосоми пшениці 1В виділеним місцем гена стійкості захворювання твердої сажки [49]

Серед усіх цих маркерів один із них - *Xgwm 259* міститься в теломерній частині довгого плеча хромосоми 1В пшениці [49]. Цей маркер є ефективнішим серед усіх представлених молекулярних маркерів, використовується в селекції для покращення гено типу пшениці, для виявлення в хромосомах генів стійкості щодо захворювання твердої сажки.

Стійкість культур пшениці до прояву піренофорозу проявляється такими найважливішими генами як *Tsn1*, *Tsn2* та гени стійкості *Ysc*. Вченими з Інституту захисту рослин НААН України разом з Інститутом харчової біотехнології та геноміки НАН України було проаналізовано 92 лінії сортів пшениці української селекції.

Метою аналізу було визначення чи присутній в цих сортах ген стійкості до цієї хвороби. Для дослідження алельного стану гена стійкості було використано два молекулярних маркерів *Xfcp623* та *Xfcp394*. У випадку алеля

чутливості (*Ts*) ампліфікується фрагмент довжиною 379 п.н. з нечутливістю до токсину А пов'язаний нуль-алель за цим маркером (*tr*) [50]. Вони виявили у більшості представлених для аналізу сортів ген стійкості *Tsn1*.

Був зроблений висновок, що частота асоційованого з проявом нечутливості алеля молекулярного маркера *Xfcp394* дорівнює 94,8%, *Xfcp623* – приблизно 72%. Остаточна точність молекулярного маркера *Xfcp394* – приблизно 87% [51].

За даними вчених генів стійкості у злакових культурах до ще одного небезпечного захворювання як борошниста роса налічується до сорока трьох.

5 з цих генів стійкості, а саме *Pm1*, *Pm3*, *Pm4*, *Pm5* та *Pm8* складаються більш ніж з одного алеля [52]. Для ефективного виявлення цих генів стійкості, треба підібрати відповідний молекулярний маркер. Науковцями з Національного університету «Києво-Могилянської академії» було досліджено поліморфізм

3D хромосоми у сортах пшениці української селекції та знайдення молекулярних маркерів для виявлення генів стійкості до борошнистої роси [52].

За їхніми даними було виявлено п'ять молекулярних маркерів, за якими можна визначити поліморфізм 3D хромосоми у пшениці, це такі маркери як *Xcfd55*, *Xcfd64*, *Xcfd152*, *Xcfd219*, *Xcfd223*.

Стійкість злакових культур, особливо пшениці до захворювання фузаріозу колоса можна класифікувати за п'ятьма типами: 1 тип – стійкість до первинного зараження; 2 тип – стійкість щодо розповсюдження ознак хвороби в колосках пшениці; 3 тип – стійкість щодо зараження насінин пшениці; 4 тип – толерантність; 5 тип – стійкість для перешкоджання появи токсинів шляхом їх розкладання [40]. Вченими було визначено зв'язок алельних станів двох взятих для аналізу гомологічних генів стійкості, які були локалізовані в хромосомах 2D і 2A у пшениці – це гени *TDF_076_2D* і

TDF_076_2A з проявом стійкості за типом 2 на рівні 14,2 % та 30% відповідно [40].

Науковцями з Інституту захисту рослин НААН України разом з Інститутом харчової біотехнології та геноміки НАН України було детально обхарактеризовано ген стійкості до фузаріозу колоса *TDF_076_2D* у 56 сортах пшениці м'якої української селекції. Для виявлення алельного стану у представлених для аналізу сортів пшениці цього гена стійкості використали такий молекулярний маркер - *INDEL1* (праймери - *INDEL1-F* (5'-TCATGCAGTGTTCCTTGATCT-3') та *INDEL1-R* (5'-CCATTCACCTTGAGCAACTTCC-3') (рис. 2.3).

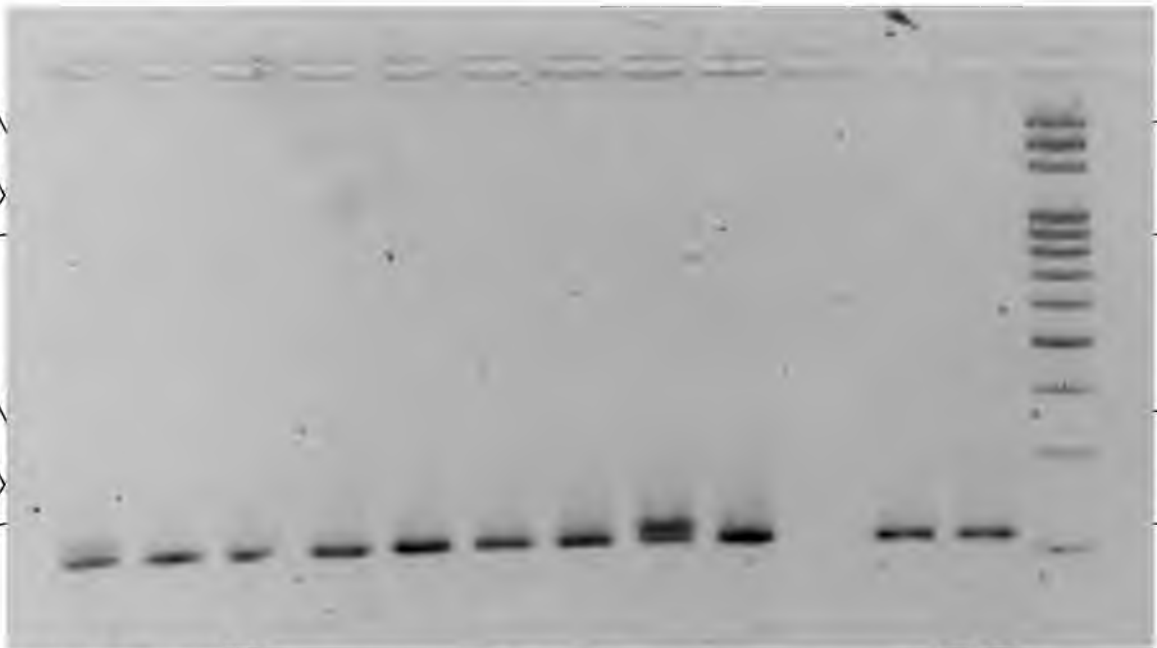


Рис. 2.3 ПЛР-аналіз на виявлення гена стійкості до фузаріозу колоса *TDF_076_2D* за допомогою молекулярного маркера *INDEL1*

Стеблова іржа, як і бура є також небезпечним захворюванням для злакових культур. В основному вона уражує стебла та листя рослин. Ми знаємо, що ген стійкості до стеблової іржі *Sr24* є найефективнішим та найпоширенішим серед сортів пшениці на Україні [53]. Даний ген стійкості застосовують для селекціонування культури пшениці у Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннезнавства та сортовивчення і в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України.

Наразі для ідентифікації цього гена стійкості було розроблено достатню кількість молекулярних маркерів (STS, SCAR), але вони є всі домінуючими.

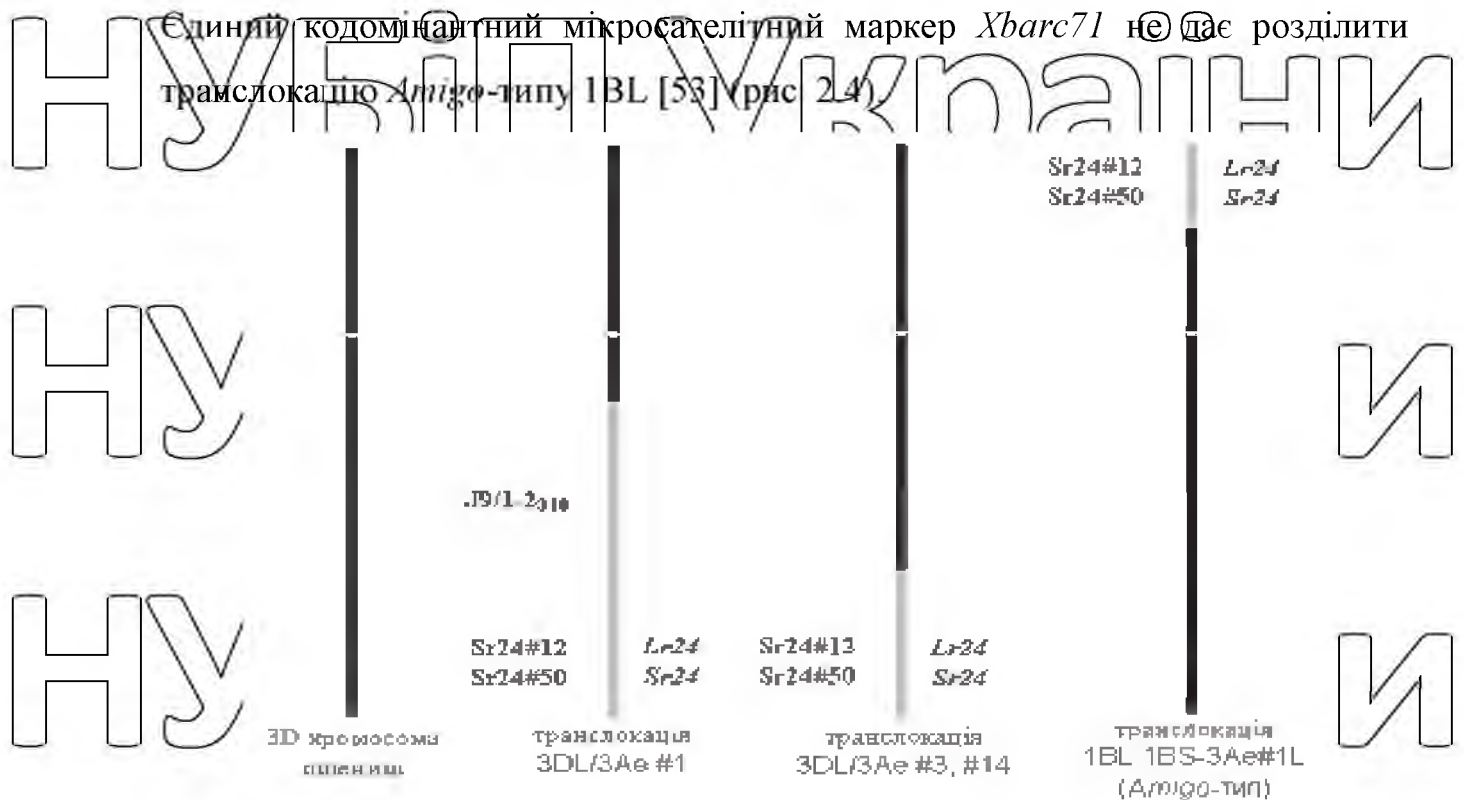


Рис. 2.4 Схематичне зображення транслокацій та положення ПЛР-маркерів [53]

Для підтвердження наявності гена стійкості до стеблові іржі *Sr24* у генотипі пшениці вже знавих сортів та ідентифікації окремих рослин двох популяцій F₂ за цим геном також було використано домінантні молекулярні маркери *19/1-2310*, *Sr24#12* та *Sr24#50* [53].

На сьогоднішній день було клоновано 9 генів пшениці, що надають стійкість до бурі (*Lrl*, *Lr21*, *Lr19*), стеблові (*Sr22*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr45*, *Sr50*) та інших збудників іржі смугастої або жовтої (*Yr10*) і всі кодуєть рецептор NLR (nucleotide-binding and leucine-rich repeat – нуклеотид зв'язуючі повтори багаті на лейцин) білки [54]. Стійкість ячменю до рас *P. graminis* 4/5 забезпечують локуси *prg4* та *prg5* відповідно вони також являють собою білки типу NLR, які функціонують разом як пара, і 1 з них містить інтегрований домен кінази, який може виконувати роль ефектора приманка. Так само локус пшениці *Lr10* також вміщує 2 гени, що кодуєть NLR, необхідні для стійкості.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Методика проведення виділення ДНК з насіння пшениці м'якої

Для проведення процесу виділення ДНК треба підготувати колекції сортів пшениці з якими будемо проводити дослідження.

Спочатку треба підготувати штатив для пробірок, ніж для різання насіння, клаптики паперу, самі пробірки на 2 мл. і сорти пшениці, які представлені для аналізу. Беремо 5 насіння з кожного сорту, кладемо на клаптик паперу і ріжемо навпіл, одну половинку кладемо в один пробірку (це для аналізу), а другу половинку – в іншу пробірку (це будуть запасні варіанти, якщо треба буде повторити дослідження). Після цього починаємо проводити процес виділення ДНК за протоколом.

ПРОТОКОЛ ВИДІЛЕННЯ ДНК

1. Беремо самплер, доливаємо по 1500-2000 мкл. лізисного буферу в кожен пробірку і ставимо мішатися на день, для того, щоб буфер не застиг і добре виділив ДНК з насіння.
2. Після промивки лізисним буфером пробірки центрифугуємо 3-4 хв. при 10000-12000 обертів.
3. Аккуратно відбираємо фільтрат (не зачіпаючи осаду) і переносимо в чисті пробірки також на 2 мл. Далі додаємо до них 20 мл розчину силіки (сорбенту) та перемішуємо на ротаторі або вручну протягом 30-40 хв.
4. Центрифугуємо пробірки з вмістом 3 хв. при 9000 обертів.
5. Обережно видалити з пробірки супернатант за допомогою самплера. Додаємо в пробірки по 500 мкл. лізисного буферу та перемішуємо на вортексі. Центрифугуємо 3 хв. при 9000 обертів.
6. Видалити фільтрат і в осад додаємо ще по 500 мкл. лізисного буферу і по 1200 мкл. відмиваючого буферу. Перемішати пробірки на вортексі та відцентрифугувати 2-3 хв. при 7000-9000 обертів.
7. Обережно видалити фільтрат самплером, додаємо до осаду по 1400 мкл. відмиваючого буферу, знову перемішуємо на вортексі і центрифугуємо 2-3 хв. при 7000-9000 обертів.

8. Повторюємо знову пункт 7

9. Обережно видаляємо супернатант, додаємо самплером 1000 мкл. 70% спирту, перемішуємо на вортексі і центрифугуємо 2 хв при 5000-7000 обертів.

10. Просушити осад при температурі 65 °С протягом 1 год.

11. Додаємо в пробірки по 500-600 мкл. деіонізованої води або 200-400 мкл. буферу ExtraGene і обережно перемішуємо на вортексі.

12. Термостуємо у твердотілому термостаті 7 хв. при 65 °С. Під час термостування 2-3 рази обережно перемішати пробірки на вортексі.

13. Центрифугуємо 3-4 хв. при 10000-12000 обертів.

Переносимо 80-90 мкл. чистого фільтрату з ДНК в пробірку для зберігання або відразу використовувати для ПЛР. ДНК зберігати при температурі +4 °С.

2.2.2. Протокол проведення ПЛР-аналізу

Після проведення виділення ДНК починаємо процес полімеразно-ланцюгової реакції. Для цього методу потрібні:

- 2х суміш для ПЛР – пробірка з синім розчином по 525 мкл (зберігається при – 20 °С);
- Суміш праймерів;
- Зразки ДНК, які потрібно аналізувати;
- Ампліфікатор (рис. 2.5).

Проводити ПЦР аналіз виключно за протоколом та в спеціальному боксі.



Рис. 2.5 Ампліфікатор для проведення ПЦР-аналізу

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕННЯ PCR

1. Перед проведенням реакції приготувати потрібну кількість пробірок для ПЦР.
2. Промаркувати пробірки згідно проведення аналізу.
3. Додати у всі пробірки по 1-5 мкл. суміші праймерів. Рекомендована кінцева концентрація праймерів 0,1-0,5 мкМ.
4. Додати у всі пробірки, враховуючи контролю, по 10 мкл. 2x суміші для ПЦР.
5. Додати у пробірки по 5 мкл. ДНК зразків, що досліджуються і (+) контроль. В якості (-) контролю можливо використати дезіонізовану воду або буфер, в якому розчиняли ДНК зразків. Загальний об'єм реакційної суміші – 20 мкл.
6. Перенести пробірки в термоблок ампліфікатора і розпочати відповідні програму.
7. Після завершення ампліфікації всі пробірки перенести в кімнату для проведення електрфорезу (детекції) ДНК.

Для кожного дослідження було підбрано різні умови ПЛР та молекулярні маркери до стеблової іржі:

- 1) З метою ідентифікації алельних станів гена *Sr39* було обрано два молекулярних маркери: *Sr39#22r* та *Sr39F2R3* [68]. Послідовності праймерів та основна інформація щодо їх характеристик представлена в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Основні характеристики молекулярних маркерів для виявлення гену стійкості *Sr39* [55]

Ген	Маркер	Послідовність праймерів	Температура відпалу	Довжина очікуваного продукту
<i>Sr39</i>	<i>Sr39F2R3</i>	Forward 5' AGAGAGAGTAGAAGAGCTGC3' Reverse 5' AGAGAGAGAGCATCCACC3'	60°C	900 п.н.
<i>Sr39</i>	<i>Sr39#22r</i>	Forward 5'- AGAGAAGATAAGCAGTAAACATG-3' Reverse 5'-TGCTGTCATGAGAGGAACCTCTG-3'	57°C	818 п.н.

Повний протокол ПЛР для використаних пар праймерів наступний: для праймера *Sr39F2R3* – 95 °C – 4 хв; 30 циклів: 95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 60 с; 72 °C – 7 хв. Для праймера *Sr39#22r* - 95 °C – 4 хв; 35 циклів: 95 °C – 30 с, 57 °C – 45 с, 72 °C – 60 с; 72 °C – 7 хв

- 2) Послідовності праймерів, які використовувались для ідентифікації алелів гена *Sr33*, наведені в таблиці 2.2. Повний протокол ПЛР для використаних пар праймерів наступний: 95 °C – 4 хв; 32 циклів: 95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 60 с; 72 °C – 7 хв [55]

Таблиця 2.2

Основна характеристика молекулярного маркера для виявлення гену стійкості *Sr33* [55]

Ген	Маркер	Послідовність праймерів	Температура відналу	Довжина очікуваного продукту
<i>Sr33</i>	На основі послідовності гена	Forward A1 5'- GCCAGTAATTTTCCTGAA ATATTGTATTGAA-3' Reverse A2 5'- TCAAATATTACAATGGGT AGGTGCATC-3'	61°C	254 п.н.

3) Для дослідження у сортах пшениці м'якої алелів локусу *Glu-B1* було підбрано такий молекулярний маркер як MAR (табл. 2.3). Використовуючи послідовність гена *Vx7* з канадського сорту *Glenlea*, були розроблені наступні праймери для ампліфікації

MAR: forward 5'-
CCTCAGCATGCAAACATGCAGC-3' і reverse 5'-
CTGAAACCTTTGGCCAGTCATGTC-3'.

Умови ампліфікації для реакції ПЛР полягали у початковому циклі при 95 °C протягом 5 хв, потім 38 циклах при 95 °C протягом 30 с, 58 °C протягом 30 с та 72 °C протягом 1 хв, з подальшим остаточним продовженням при 72 °C на 5,25 хв.

2.2.3 Методика проведення процесу електрофорезу та візуалізації результатів

Результати ПЛР потрібно візуалізувати шляхом електрофорезу на 2 % агарозному гелі та 1X трис-боратному буфері із додаванням в якості фарбника бромистого етидію із подальшим використанням системи для гель-документації VISION Gel.

Для самого методу електрофорезу потрібно приготувати всі необхідні розчини.

1. Приготування 10X TBE (електродний) буфер (для нього потрібні такі інгредієнти: трис(гідроксиметил)амінометан, борна кислота H_3BO_3 , 0.5M розчин EDTA)

1.1. Зважуємо 108 г трис(гідроксиметил)амінометану $((HOCH_2)_3CNH_2)$ та 55 г борної кислоти H_3BO_3 ;

1.2. Додаємо 40 мл 0.5M розчину EDTA, pH 8.0;

1.3. Доливаємо приблизно 800 мл дистильованої води;

1.4. Витримуємо при постійному помішуванні до повного розчинення компонентів буферу;

1.5. Переливаємо в пікнометр на 1000 мл, доводимо до мітки дистильованою водою та фільтруємо.

2. Готуємо 1X TBE буфер

2.1. За допомогою мірного циліндра відбираємо 100 мл 10X TBE, переливаємо в пікнометр на 1000 мл;

2.2. Доводимо до потрібної мітки дистильованою водою.

3. Готуємо 1 % розчин бромистого етидію

3.1. Зважуємо на вагах 0.1 г бромистого етидію;

3.2. Розчиняємо в 10 мл бідистильованої води.

4. Готуємо 2 % агарозний гель

4.1. Зважуємо 2 г сухої агарози;

4.2. Відбираємо 100 мл 1X TBE буферу;

4.3. Заливаємо агарозу 1X TBE буфером у мірній колбі;

4.4. Цю мірну колбу ставимо в мікрохвильову піч для повного розчинення агарози;

4.5. Витримуємо при кімнатній температурі близько 5-ти хвилин;

4.6. Додаємо 10 мкл 1% розчину бромистого етидію та перемішуємо мірну колбу;

4.7. Заливаємо в попередньо зібрану форму з гребінкою для формування лунки (рис. 2.6);

4.8. Витримуємо при кімнатній температурі до повної полімеризації гелю (приблизно 1 годину).



Рис. 2.6 Пристрій для проведення електрофорезу



Рис. 2.7 Система для гелю-документації VISION Gel (візуалізація результатів)

Для візуалізації результатів ПЛР шляхом методу електрофорезу нам потрібні зразки сортів, з якими було проведено ПЛР аналіз, 2 % агарозний гель, 1X TBE буфер та прилад для візуалізації результатів.

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕННЯ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

1. Промиваємо коритце водопровідною водою, ставимо її в камеру для електрофорезу та ставимо гребінку;
2. Заливаємо 2% агарозним гелем і чекаємо поки він застигне;
3. Заливаємо 1X TBE буфером, доставши при цьому гребінку;
4. Наносимо в лунки продукти ампліфікації в об'ємі 10 мкл;
5. Електрофорез проводимо протягом 1 год. 10 хв. – 1 год. 40 хв. при робочій різниці потенціалів 110 – 140 В.

Гель після електрофорезу візуалізують під ультрафіолетом за допомогою системи для гель-документації VISION Gel (рис. 2.7).

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Аналіз ліній пшениці м'якої на наявність гена стійкості *Sr33*

Для ідентифікації гена стійкості стебловій іржі такого як *Sr33* було відібрано 108 зразків пшениці м'якої вітчизняної селекції 2020 року посіву (табл. 3.1). У процесі визначення в досліджуваних лініях наявність гена стійкості до стебловій іржі *Sr33* було ідентифіковано 60 ліній, які містять даний ген (55 %), 15 зразків виявилися поліморфними (14 %) та 33 зразків не мали у собі ген стійкості до стебловій іржі (31 %). Результати представлені на рис. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8.

Таблиця 3.1

№ п.п	№ пробірки	№ зразка	<i>Sr33</i> *
1	401	1а (я1р13 (103))	+/-
2	402	2а (я1р13 (103))	-
3	403	3а (я1р13 (103))	-
4	404	4а (я1р13 (103))	+/-
5	405	5а (я1р13 (103))	-
6	406	6а (я1р13 (104))	+
7	407	7а (я1р13 (104))	+
8	408	8а (я1р13 (104))	+
9	409	9а (я1р13 (104))	+
10	410	10а (я1р13 (104))	+
11	411	11а (я1р13 (105))	-
12	412	12а (я1р13 (105))	-
13	413	13а (я1р13 (105))	+
14	414	14а (я1р13 (105))	+
15	415	15а (я1р13 (105))	-
16	416	16а (я1р13 (112))	+/-
17	417	17а (я1р13 (112))	+/-
18	418	18а (я1р13 (112))	+/-

Продовження таблиці 3.1

19	419	19а (я1р13 (112))	+/-
20	420	20а (я1р13 (112))	+/-
21	421	21а (я1р14 (114))	-
22	422	22а (я1р14 (114))	+/-
23	423	23а (я1р14 (114))	+/-
24	424	24а (я1р14 (114))	+/-
25	425	25а (я1р14 (114))	-
26	426	26а (я1р14 (115))	+
27	427	27а (я1р14 (115))	+
28	428	28а (я1р14 (115))	+
29	429	29а (я1р14 (115))	+
30	430	30а (я1р14 (116))	+
31	431	31а (я1р14 (116))	-
32	432	32а (я1р14 (116))	-
33	433	33а (я1р14 (116))	-
34	434	34а (я1р14 (116))	-
35	435	35а (я1р14 (119))	-
36	436	36а (я1р14 (119))	-
37	437	37а (я1р14 (119))	-
38	438	38а (я1р14 (119))	-
39	439	39а (я1р14 (119))	-
40	440	40а (я1р15 (121))	+
41	441	41а (я1р15 (121))	+
42	442	42а (я1р15 (121))	+
43	443	43а (я1р15 (121))	+/-
44	444	44а (я1р15 (128))	+/-
45	445	45а (я1р15 (128))	+
46	446	46а (я1р15 (128))	+

НУБІП України			
47	447	47а (я1р15 (128))	+
48	448	48а (я1р15 (128))	+
49	449	49а (я1р15 (137))	+/-
50	450	50а (я1р15 (137))	+/-
51	451	51а (я1р15 (137))	+/-
52	452	52а (я1р15 (137))	+
53	453	53а (я1р15 (137))	+
54	454	54а (я1р16 (140))	+
55	455	55а (я1р16 (140))	+
56	456	56а (я1р16 (140))	+
57	457	57а (я1р16 (140))	+
58	458	58а (я1р16 (140))	+
59	459	59а (я1р16 (144))	+
60	460	60а (я1р16 (144))	+
61	461	61а (я1р16 (144))	+
62	462	62а (я1р16 (144))	+
63	463	63а (я1р16 (144))	+
64	464	64а (я1р16 (148))	+
65	465	65а (я1р16 (148))	+
66	466	66а (я1р16 (148))	+
67	467	67а (я1р16 (148))	+
68	468	68а (я1р16 (148))	+
69	501	НК20 я3р37	-
70	502	НК20 я3р37	+
71	503	НК20 я3р37	+
72	504	НК20 я3р37	+
73	505	НК20 я3р37	+

Продовження таблиці 3.1

74	506	НК20 я3р37	+
75	507	НК20 я3р37	+
76	508	НК20 я3р37	+
77	509	НК20 я3р37	+
78	510	НК20 я3р37	+
79	511	НК20 я3р37	+
80	512	НК20 я3р37	+
81	513	НК20 я3р37	+
82	514	НК20 я3р37	+
83	515	НК20 я3р37	+
84	516	НК20 я3р37	-
85	517	НК20 я3р37	-
86	518	НК20 я3р37	-
87	519	НК20 я3р37	+
88	520	НК20 я3р37	+
89	521	НК20 я3р31	-
90	522	НК20 я3р31	-
91	523	НК20 я3р31	-
92	524	НК20 я3р31	-
93	525	НК20 я3р31	-
94	526	НК20 я3р31	-
95	527	НК20 я3р31	-
96	528	НК20 я3р31	-
97	529	НК20 я3р31	-
98	530	НК20 я3р31	+
99	531	НК20 я3р31	-
100	532	НК20 я3р31	+
101	533	НК20 я3р31	+

Продовження таблиці 3.1

102	534	НК20 я3р31	+
103	535	НК20 я3р31	+
104	536	НК20 я3р31	+
105	537	НК20 я3р31	+
106	538	НК20 я3р31	+
107	539	НК20 я3р31	+
108	540	НК20 я3р31	+

* знаком «+» позначені зразки, де було виявлено ампліфіковані фрагменти відповідної довжини асоційовані зі стійкістю до стеблової іржі, знаком «-» – зразки, де такого фрагмента виявлено не було і які відповідно не мають генетичної стійкості, «+/-» – зразки поліморфні.

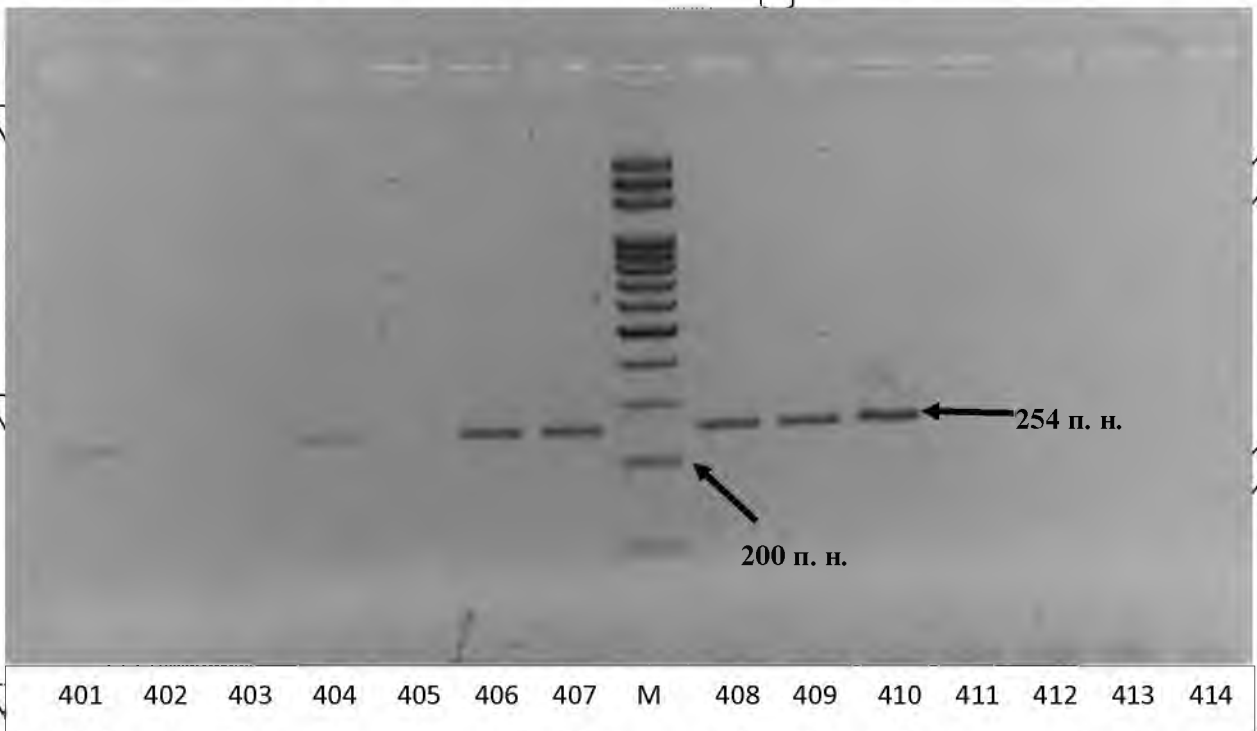


Рис. 3.1 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 401 - (+/-); № 402 - (-); № 403 - (-); № 404 - (+/-); № 405 - (-); № 406 - (+); № 407 - (+); № 408 - (+); № 409 - (+); № 410 - (+); № 411 - (-); № 412 - (-); № 413 - (-); № 414 - (-)

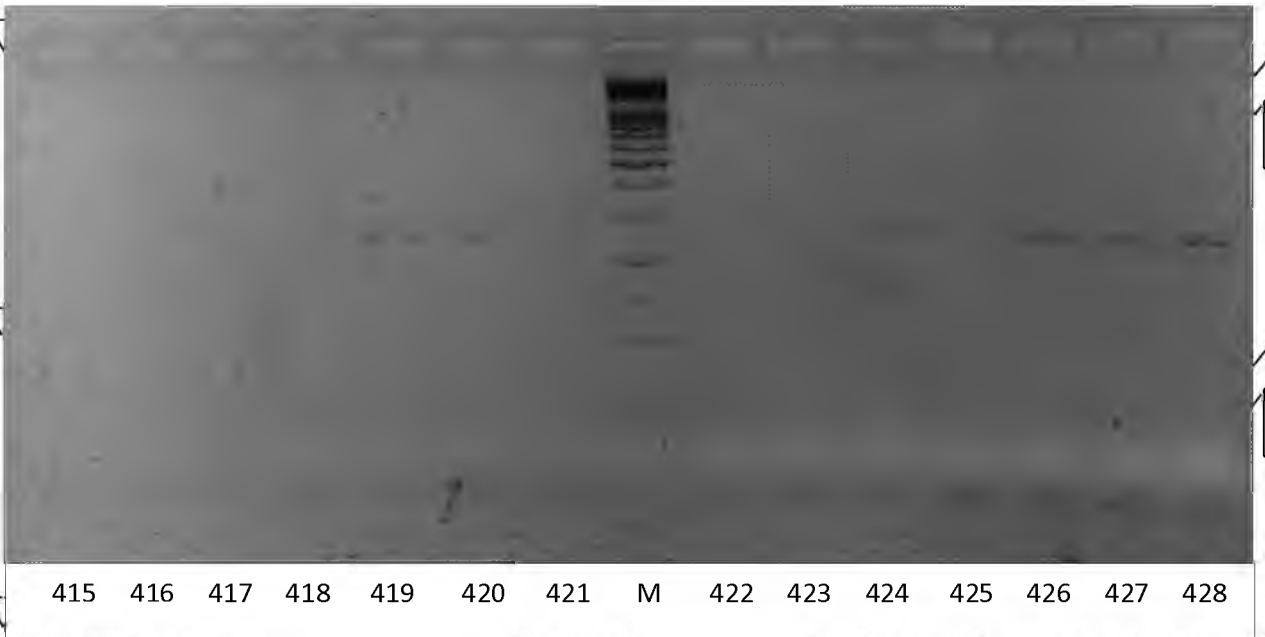


Рис. 3.2 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 415 - (-); № 416 - (+/-); № 417 - (+/-); № 418 - (+/-); № 419 - (+/-); № 420 - (+/-); № 421 - (-); № 422 - (+/-); № 423 - (+/-); № 424 - (+/-); № 425 - (-); № 426 - (+); № 427 - (+); № 428 - (+)

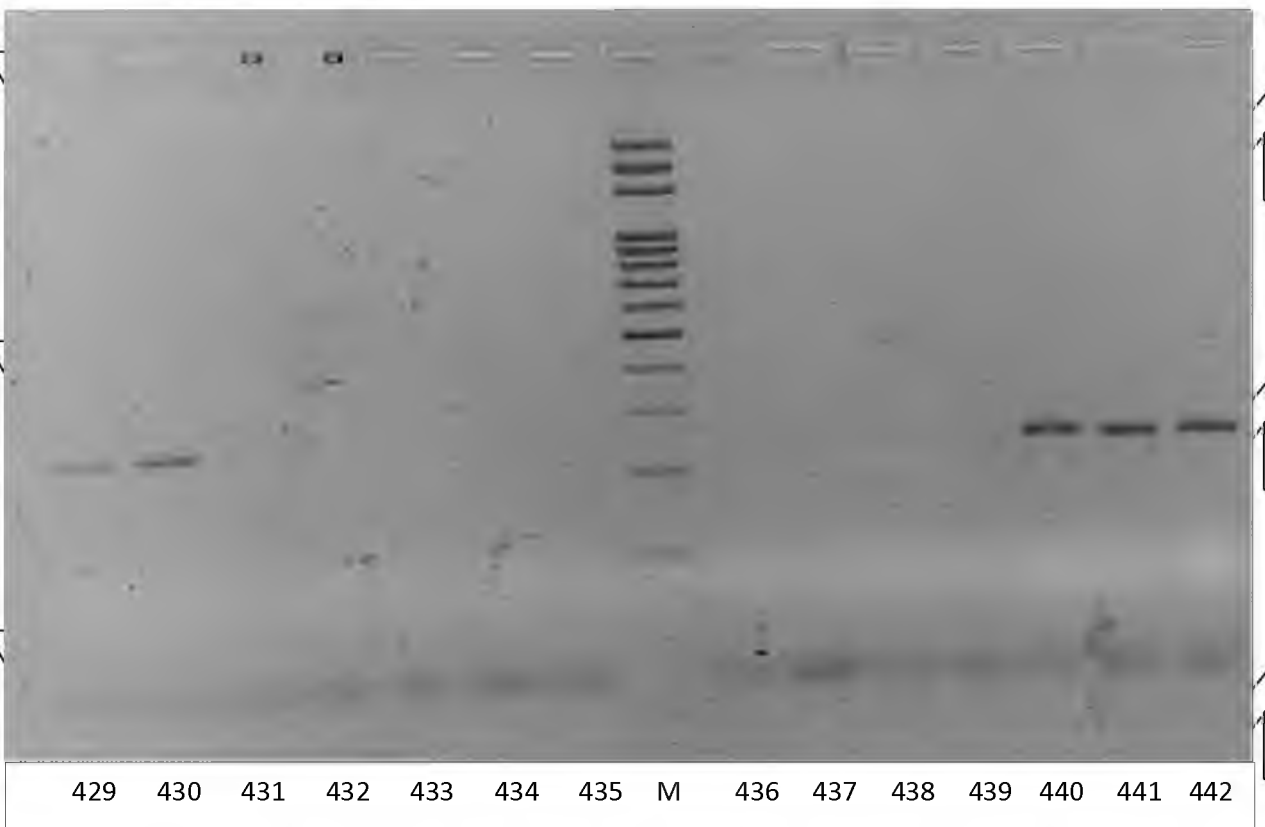


Рис. 3.3 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 429 - (+); № 430 - (+); № 431 - (-); № 432 - (-); № 433 - (-); № 434 - (-); № 435 - (-); № 436 - (-); № 437 - (-); № 438 - (-); № 439 - (-); № 440 - (+); № 441 - (+); № 442 - (+)

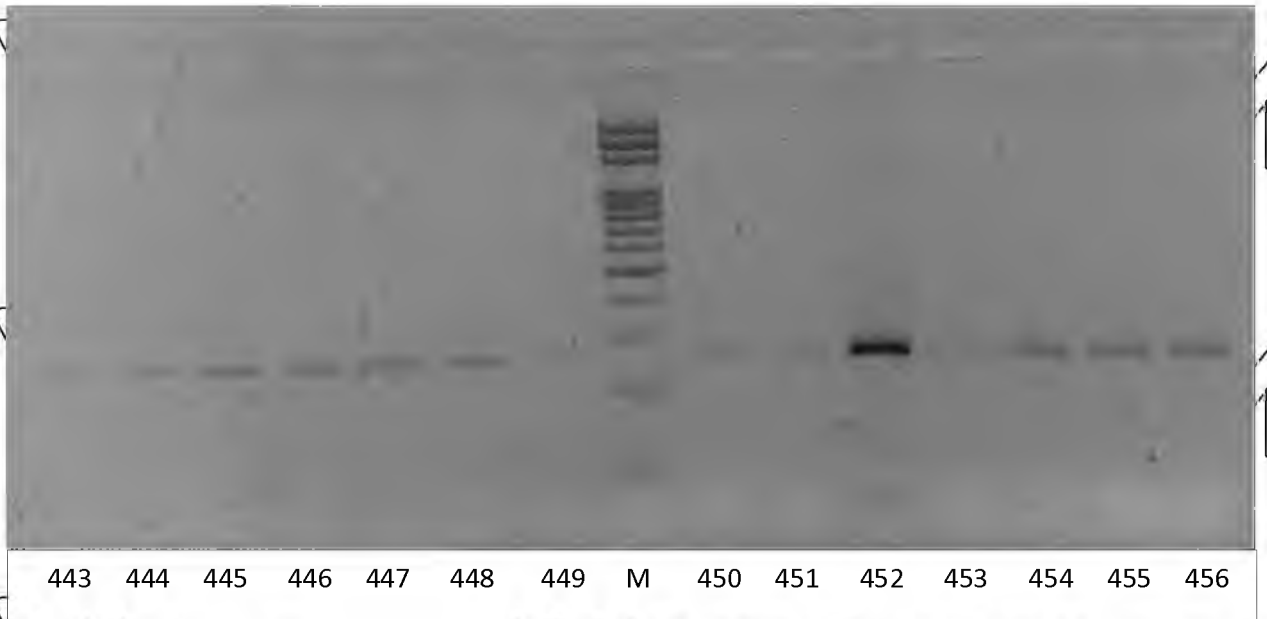


Рис. 3.4 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 443 - (+/-); № 444 - (+/-); № 445 - (+); № 446 - (+); № 447 - (+); № 448 - (+); № 449 - (+/-); № 450 - (+/-); № 451 - (+/-); № 452 - (+); № 453 - (+); № 454 - (+); № 455 - (+); № 456 - (+)

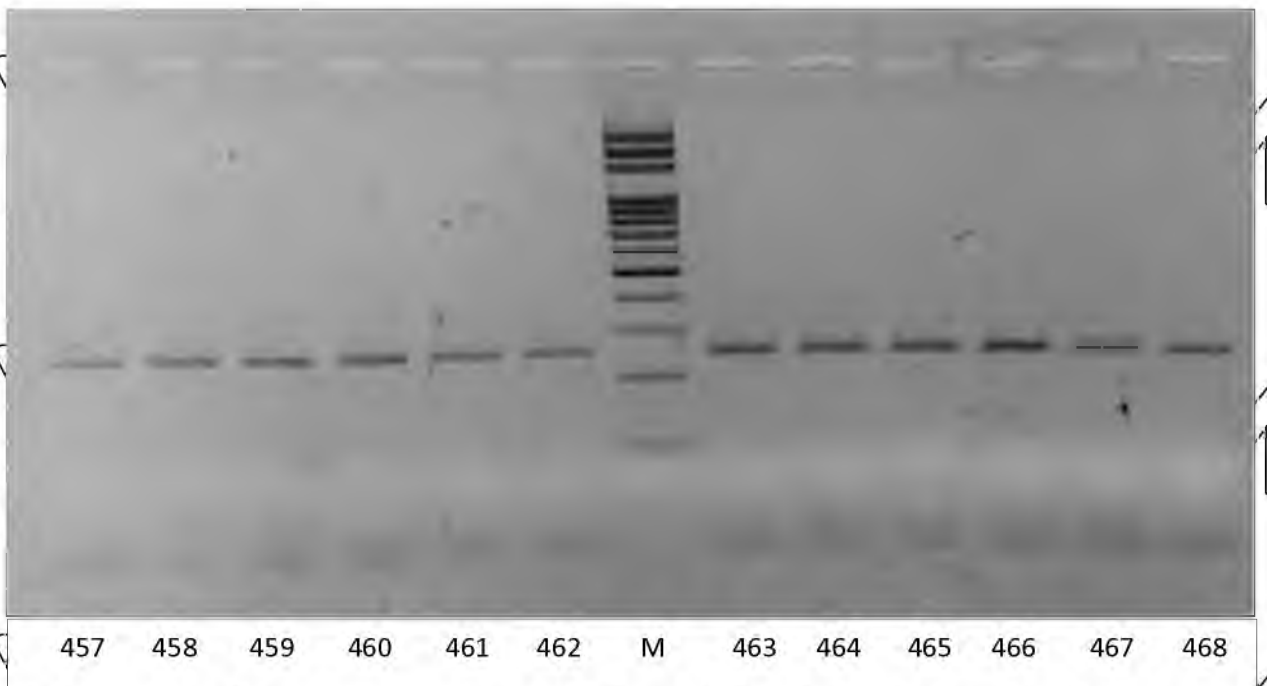


Рис. 3.5 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 457 - (+); № 458 - (+); № 459 - (+); № 460 - (+); № 461 - (+); № 462 - (+); № 463 - (+); № 464 - (+); № 465 - (+); № 466 - (+); № 467 - (+); № 468 - (+)

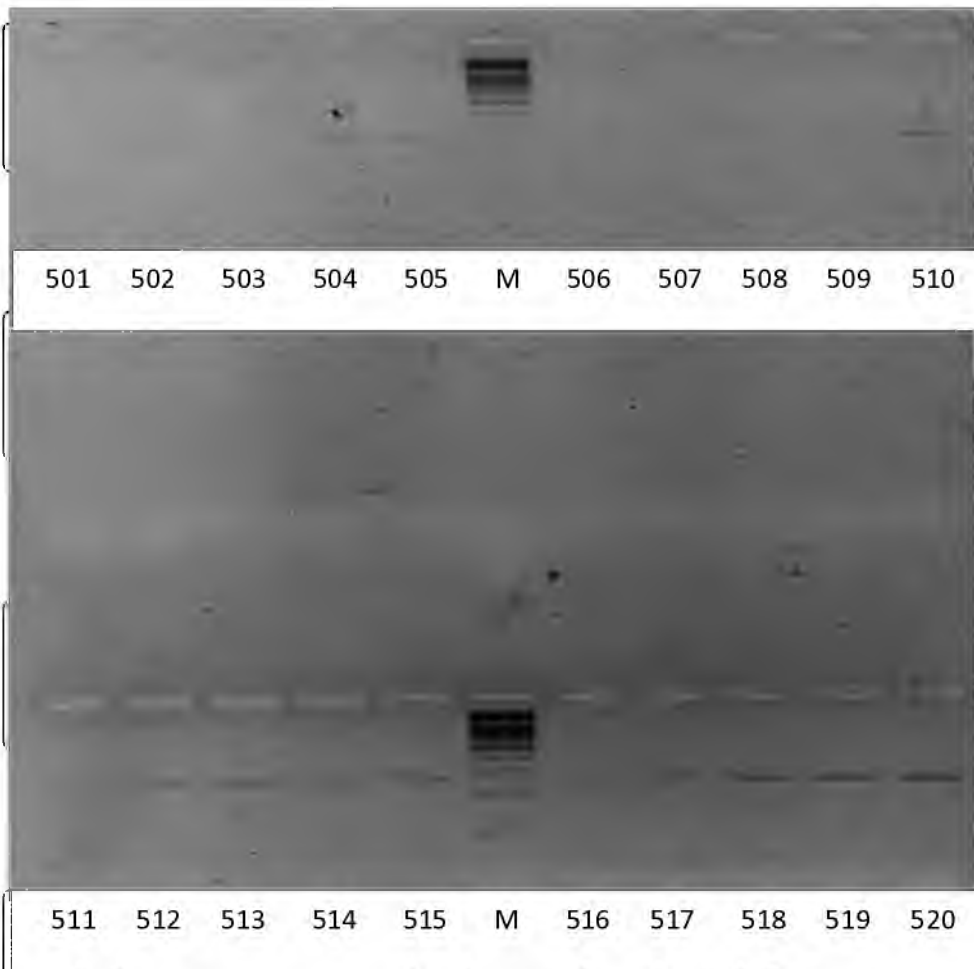


Рис. 3.6 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 501 - (-); № 502 - (-); № 503 - (-); № 504 - (-); № 505 - (-); № 506 - (-); № 507 - (-); № 508 - (-); № 509 - (-); № 510 - (+); № 511 - (+); № 512 - (+); № 513 - (+); № 514 - (+); № 515 - (+); № 516 - (+); № 517 - (+); № 518 - (+); № 519 - (+); № 520 - (+)

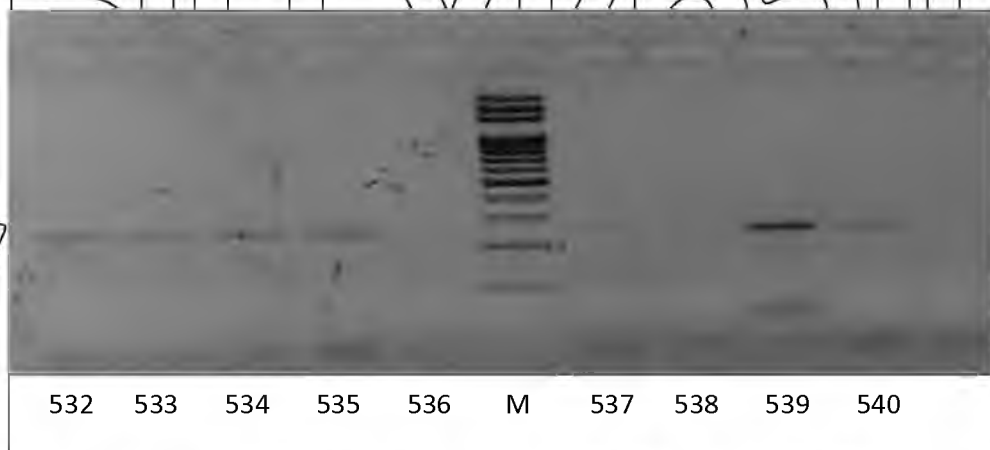


Рис. 3.7 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 532 - (+); № 533 - (+); № 534 - (+); № 535 - (+); № 536 - (-); № 537 - (-); № 538 - (-); № 539 - (+); № 540 - (+)

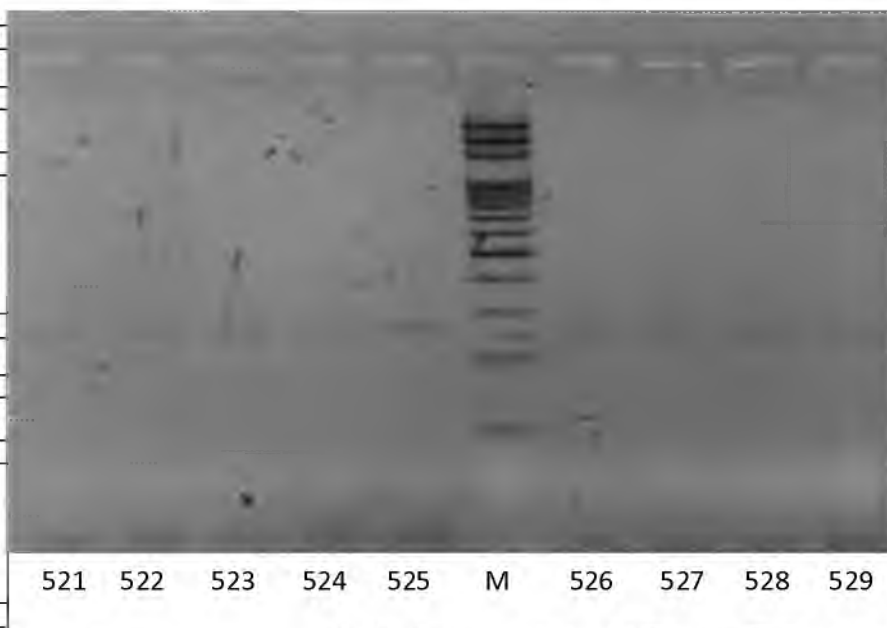


Рис. 3.8 Результати ПЛР-аналізу на *Sr33*: № 521 - (-); № 522 - (+); № 523 - (+); № 524 - (+); № 525 - (+); № 526 - (+); № 527 - (+); № 528 - (+); № 529 - (+)

3.2 Ідентифікація гена стійкості *Sr39* у лініях пшениці м'якої

З допомогою молекулярно-генетичних маркерів було проаналізовано набір ліній пшениці власної селекції, які були відібрані в якості потенційних донорів генів *Sr33*, *Sr39*, що надають стійкість до раси стебловій іржі Ug99.

Для ідентифікації даного гену стійкості було підібрано 14 ліній пшениці м'якої 2020 року посіву (табл. 3.2).

Таблиця 3.2
Список ліній пшениці м'якої для аналізу на ген стійкості до стеблової іржі *Sr39*

№ зразка	Назва	Результати ПЛР із праймерами, що фланкують маркер <i>Sr3341</i>
1	Лінія 160	-
2	Лінія 161	-
3	Лінія 162	+
4	Лінія 163	+

Продовження таблиці 3.2

5	Лінія 164	+
6	Лінія 165	-
7	Лінія 166	+
8	Лінія 167	-
9	Лінія 168	-
10	Лінія 169	+
11	Лінія 170	+
12	Лінія 171	+
13	Лінія 172	+
14	Лінія DN31	-

Приклад результатів ампліфікації із праймерами, які фланкують маркер *Sr39#22r* наведено на рис. 3.9. Очікувана довжина ампліконів маркерної послідовності, асоційована з алелем стійкості гена *Sr39 - 818 п.н.*

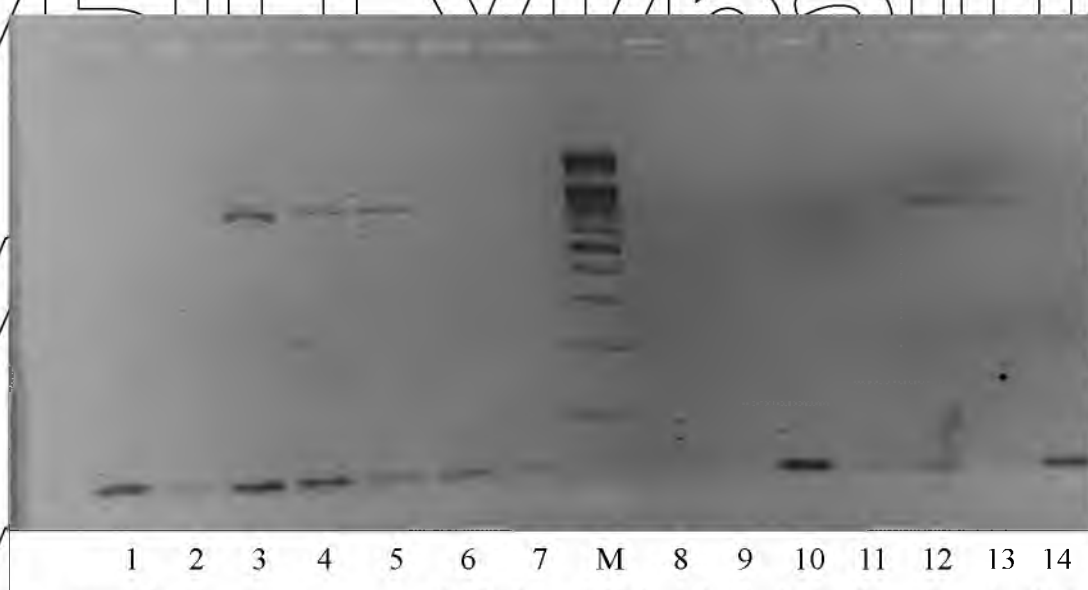


Рис. 3.9 Результати ПЛР із праймерами, що фланкують маркер *Sr39#22r* та ДНК зразків пшениці, використаних у дослідженні. Лунки: 1 - Лінія 160; 2 - Лінія 161; 3 - Лінія 162; 4 - Лінія 163; 5 - Лінія 164; 6 - Лінія 165; 7 - Лінія 166; M - маркер молекулярних мас, ціна поділки 100 п.н.; 8 - Лінія 167; 9 - Лінія 168; 10 - Лінія 168-1; 11 - Лінія 169; 12 - Лінія 170; 13 - Лінія 171; 14 - Лінія DN31

3.3 Визначення генів ознак хлібопекарської якості за допомогою молекулярних маркерів

Аналіз ознак хлібопекарської якості у пшениці м'якої дає чітке розуміння того, як даний сорт чи лінія с/г культури пристосована до вирощування, які умови їй притаманні та інше. В своїй роботі я оцінював таку якісну ознаку як наявність алелів локусу *Glu-B1* надвисокої та високої якості у сортах пшениці (алелі локусу запасних білків).

Запасні білки в зерні пшениці – гліadini і глютеніни – становлять 80-85 % загального білка ендосперму, містять 50 % гліадину, 10 – високомолекулярного глютеніну [56]. Гліадини є сумішшю індивідуальних поліпептидів, тоді як глютеніни – не індивідуальний білок, а продукт агрегації різнорідних молекул проламіну, що включає також альбумін-глобулінові білки. Глютеніни впливають на пружність, еластичність, в'язкість і розтяжність тіста (реологічні властивості).

Для своєї дослідної роботи було взято вибірку полтавських (табл. 3.3) та харківських сортів (табл. 3.4), в кількості 13 та 18 штук відповідно, плюс два контролю: сорт DH31 та CS. Очікувана довжина ампліконів: для алелів *Glu-B1u* – 520 bp, *Glu-B1al* – 563 bp.

Таблиця 3.3

Список полтавських сортів для аналізу на запасні білки

№ п/п	№ зразка	Назва сорту	<i>Glu-b1*</i>
			Запасні білки алелі
1	660	Кармелюк	u
2	664	Соната полтавська	u
3	668	Д-38	u
4	669	Д-62	u
5	674	Д-54	u

Продовження таблиці 3.3

6	678	Д-43	u
7	680	Царичанка	u
8	682	Сагайдак	u
9	684	Диканька	u
10	690	Недра	al
11	691	Добірня	al
12	692	Хоривиця	u
13	DH	DH31	al

* u – запасний білок середньої якості; al – запасний білок надвисокої якості.

Таблиця 3.4

№ п/п	№ зразка	Назва сорту	Glu-b1
1	3031	Ер 67-18	u + al
2	3032	Ер 90-18	u
3	3033	Ер-126-18	u
4	3038	Ер-126-18	u
5	3044	Лют 1311-18	u
6	3047	Ер-114-18	u
7	3052	Ер-352-18	al
8	3053	Ер-433-18	u
9	3054	Ер-438-18	u
10	3056	Ер-513-18	u
11	3057	Ер-524-18	al
12	3061	Ер-951-18	u
13	3069	Диво	al
14	3074	Фермерка	u + al
15	3075	Краса ланів	u
16	3077	Ер-419-20	u
17	3078	Ер-833-20	u + al
18	3079	Ер-835-20	u + al
19	DH	DH31	al
20	CS	Chinese spring	u

Результати досліджень ПЛР-аналізів представлена на рисунках 3.10,

3.11, 3.12.

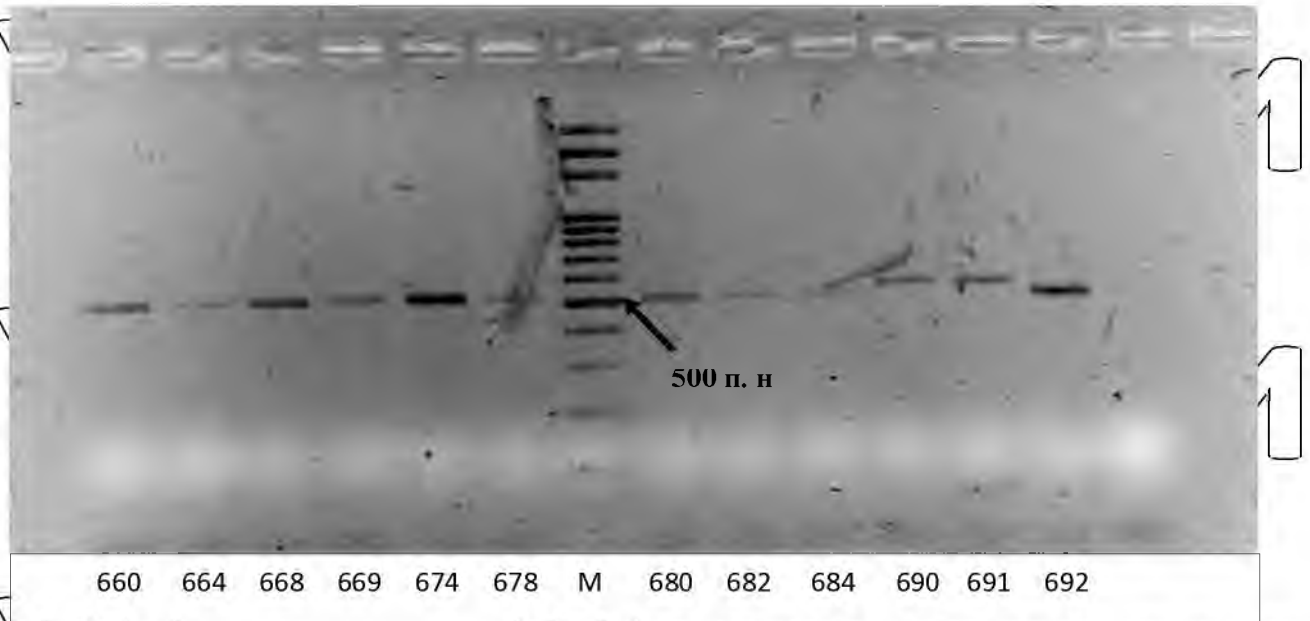


Рис. 3.10 Результати ПЛР-аналізу полтавських сортів з використанням маркера *MAR*: № 660 – u; № 664 – u; № 668 – u; № 669 – u; № 674 – u; № 678 – u; № 680 – u; № 682 – u; № 684 – u; № 690 – al; № 691 – al; № 692 – u

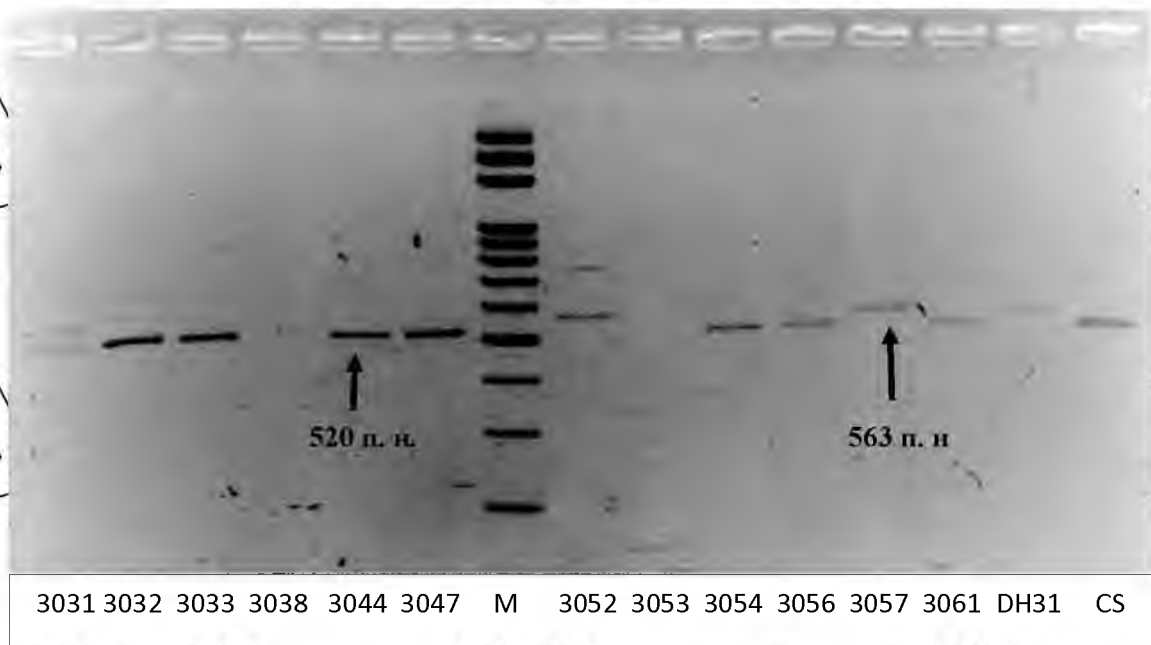


Рис. 3.11 Результати ПЛР-аналізу харківських сортів з використанням маркера *MAR*: № 3031 – u + al; № 3032 – u; № 3033 – u; № 3038 – u; № 3044 – u; № 3047 – u; № 3052 – al; № 3053 – u; № 3054 – u; № 3056 – u; № 3057 – al; № 3061 – u; № DH31 – al; № CS – u

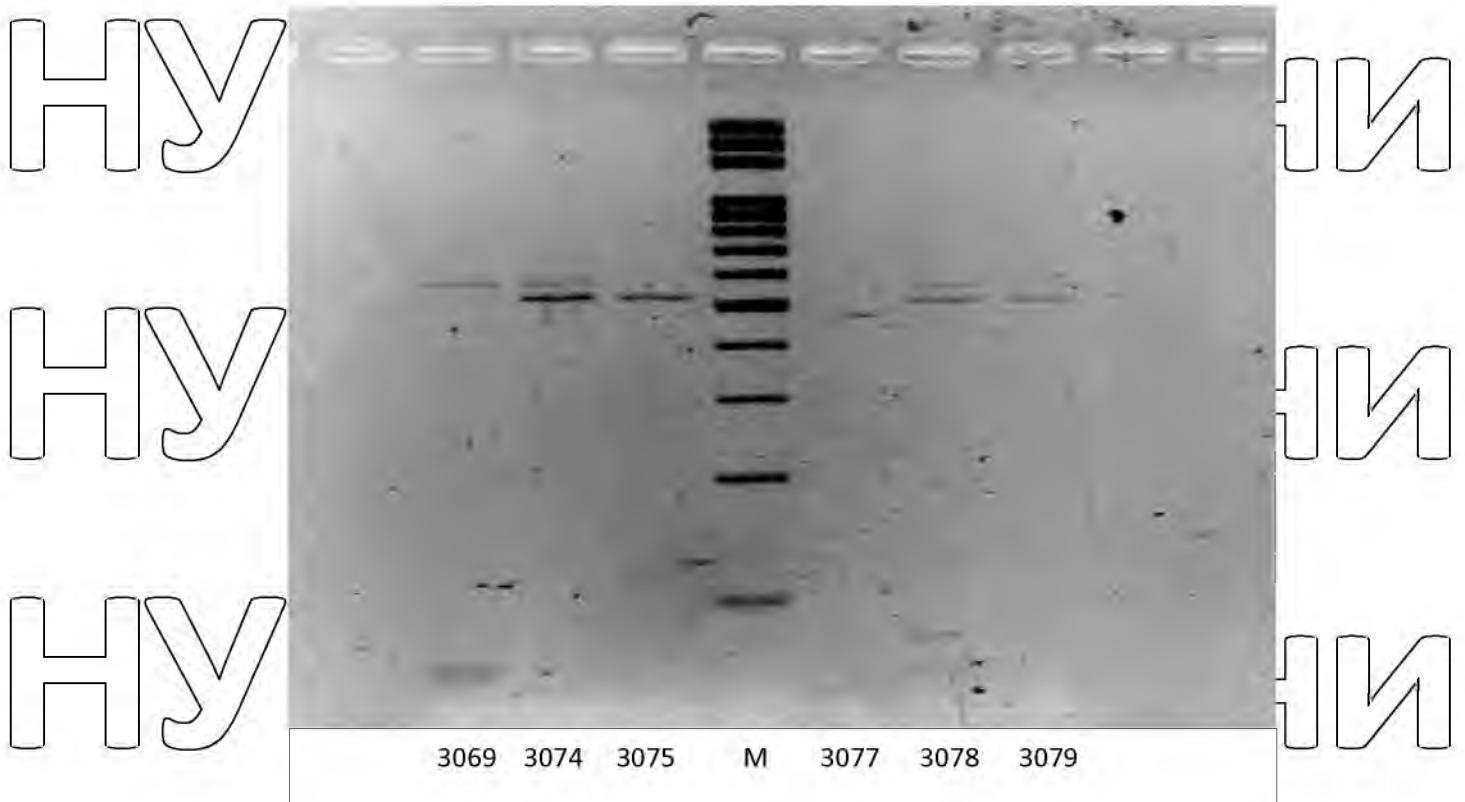


Рис. 3.12 Результати ПЛР-аналізу харківських сортів з використанням

маркера *MAR*: № 3069 - al; № 3074 - u + al; № 3075 - u; № 3077 - u; № 3078 - u + al; № 3079 - u + al

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

Отже, на сучасному етапі становлення біотехнології як науки застосовують нові методи молекулярної біології з використанням молекулярних маркерів для виявлення більш якісних та стійких сортів та ліній сільськогосподарських культур. Представлені у цій роботі для аналізу сорти та лінії здатні посилити селекційний стан в Україні, підвищити ефективність урожайності сільськогосподарських культур та покращити якість зерна.

Впровадження ДНК-технологій в селекційний процес дав змогу більш чітко та широко вивчати сорти та лінії с/г культур на присутність в них генів стійкості до різних видів захворювань буцімто гриби чи вірусні, ідентифікувати різні якісні характеристики рослини, а саме метеорологічні фактори (морозостійкість, посухостійкість), наявність деяких компонентів для життєдіяльності с/г рослини (запасні білки у пшениці).

За опрацьованим дослідним матеріалом та аналізованими даними експериментальної частини роботи було зроблено такі висновки:

- 1) З якісних ознак сортів та ліній пшениці м'якої (*Triticum aestivum*) було проаналізовано локус *Glu-B1*, з використанням маркера MAR їхня різноманітність; з кількісних – наявність генів стійкості до такого виду захворювання як стеблова іржа, яка широко розповсюджена на території Лісостепу та Степу України
- 2) За результатами дослідження було відібрано лінії пшениці, які є переважно стійкими до стеблової іржі, а саме за геном стійкості *Sr33* – 60 ліній із 108 зразків містили в собі цей ген; за геном стійкості *Sr39* – 8 ліній із 14 запропонованих для аналізу містили в собі цей ген.
- 3) Під час аналізу на виявлення локусів у вибірці харківських (та полтавських сортах пшениці було виявлено: із представлених 33 сортів – 7 сортів (21 %) мають у своєму генотипі *Glu-B1a1* (563 п.н), 4 сорти (12 %) – гетерогенні, тобто алелі *Glu-B1a1* та *Glu-B1u* (22 сорти (67 %) мають у своєму генотипі алель *Glu-B1u*.

4) Більшість результатів аналізу молекулярних маркерів у сортів та ліній пшениці можуть бути використаними в селекційній роботі, як вихідне джерело для цілеспрямованого підбору пар для схрещення та відбору ліній пшениці з бажаними ознаками.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Нова хвиля «Зеленої революції». Перспективи застосування в Україні досягнень молекулярної біотехнології та геноміки / Я. Блжом, Ю. Сиволап, Р. Рудий, О. Созінов // Вісник НАН України, 2006, № 3, с. 21-31.
2. Кудрявцев А. М. Маркер-опосредованная селекция растений // Молекулярная и прикл. генетика. – 2009. – Т. 9. – С. 28-31.
3. Concibido V.C., Denny R.L., Lange D.A. et al. RFLP mapping and molecular marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332 // Crop Sci. – 1996. – V. 36. – P. 1643-1650.
4. Добір за допомогою молекулярних маркерів в селекції рослин / Н. Е. Кожухова // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2011, с. 35-43.
5. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культ. растений. – 2002. – Т. 34, № 4. – С. 279-296.
6. Weising K. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. – 2005. – 470 p.
7. Syvanen A. C. Toward genome-wide SNP genotyping // Nature Genet. – 2005. – V. 37. – P. S5-S10.
8. Giancola S. Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and Taq-Man, in diploid and polyploidy plants // Theor. Appl. Genet. – 2016. – V. 112. – P. 1115-1124.
9. Lubberstedt T. Development and application of functional markers in maize // Euphytica. – 2015. – V. 146. – P. 101-108.
10. Guimaraes E. P. Marker-assisted selection, current status, and future perspectives in crops, livestock, forestry, and fish. – FAO, Rome, 2007.
11. Молекулярные маркеры и селекция / Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика, 2013, с. 71-80.
12. Моргул В.В., Санін Є.В., Швартау В.В. Клуб 100 центнерів. Сучасні сорти та оптимальні системи живлення й захисту озимої пшениці / Ін-т фізіології

рослин і генетики НАН України, Компанія «Сингента», Швейцарія. —

Вид. 9-е. К.: Логос, 2015. — 148 с.

13. Силкова О.Г., Шапова А.И., Шумный В.К. Передача генетического

материала ржи в геном мягкой пшеницы методом межгеномного

замещения хромосом // Вестн. ВОГиС. — 2008. — 12, № 4. — С. 654—661.

14. Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. — К.: Логос, 2014. — 375 с.

15. Власенко В.А. Створення вихідного матеріалу для адаптивної селекції і

введення високопродуктивних сортів пшениці в умовах Лісостепу

України: Автореф. ... дис. д-ра с.-г. наук. — Одеса, 2008. — 48 с.

16. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці / Б. В. Моргун // Фізіологія рослин і

генетика, 2016, с. 324 – 343.

17. Белан И.А., Россеева Л.П., Трубачеева Н.В. и др. Особенности

хозяйственно-ценных признаков линий сорта яровой мягкой пшеницы

Омская 37, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS 1BL // Вестн.

ВОГиС. — 2010. — 14, № 4. — С. 632—640.

18. Schlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. — 2015. —

V0415 1-18. — Режим доступу: [http://www.rye@gene-map.de/rye-](http://www.rye@gene-map.de/rye-introgression)

[introgression](http://www.rye@gene-map.de/rye-introgression)

19. Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern

cultivars of *Triticum aestivum* L. // Euphytica. — 1998. — 100. — P. 323—340.

20. Singh N.K., Shepherd K.W., McIntosh R.A. Linkage mapping of genes for

resistance to leaf, stem and stripe rust and scalins on the short arm of rye

chromosome 1R // Theor. Appl. Genet. — 1990. — 80. — P. 609—616.

21. Козуб Н.А., Созинов И.А., Собко Т.А. и др. Идентификация ржаных

транслокаций у сортов озимой мягкой пшеницы Богданка и Синтетик //

Научные ведомости Белгородского университета. Сер. Естественные науки. — 2010. —

Вып. 12, № 15 (86). — С. 1—7.

22. Впровадження молекулярних маркерів у дослідження генетичного поліморфізму м'якої пшениці в Південному біотехнологічному центрі в рослинництві / Чеботар С.В. // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015. Том 17, с. 97-102.

23. Чеботар С.В., Куракіна К.О., Хохлов О.М., Чеботар Г.О., Сиволап Ю.М. Фенотипічні прояви алелів нуридолинових генів м'якої пшениці // Цитологія і генетика – 2011. – № 4. – С. 8–19.

24. Поліщук А.М., Чеботар С.В., Благодарова О.М., Козуб Н.А., Созінов І.О., Сиволап Ю.М. Аналіз сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ІДР з алель-специфічними праймерами до *Glu* та *Glu*-локусів // Цитологія і генетика. – 2010. – № 6. – С. 22–31.

25. Zhang W., Gianibelli M.C., Rampling L. R. Characterization and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu*-A3 alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. appl. Genet. – 2004. – 108. – P. 1409–1419.

26. Поліморфізм маркера гена *TDF 076 2D* помірної стійкості проти фузаріозу колоса серед сортів пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) степової зони України / А. В. Карелов, Н. О. Козуб, І. О. Созінов, 2015.

[Електронний ресурс]. Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_2/7.pdf

27. Берлянд-Кожевников, В. М. Селекція пшениць на устійчивість к основним грибным болезням. Обзорная информация / В. М. Берлянд-Кожевников, М. А. Федин. – М.: ВНИИТЭИСХ. – 1977. – 56 с.

28. Файт, В. І. Генетичні системи адаптивності та розширення різноманіття зернових колосових культур / В. І. Файт, А. Ф. Стельмах, І. І. Мощний, Н. П. Ламарі // Збірник наукових праць СГІ-НЦНС, вип. 16 (56). – Одеса. – 2010. – С. 118–130.

29. Лабораторна робота 2. Тема: Хвороби пшениці / Фітопатологія. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.tsau.edu.ua/ros/wordpress/uploads/sites/20/1r.2.hvoroby-pshenyca.pdf>

30. Исмаилов, Х. А. Исследования по иммунитету пшеницы к болезням в Азербайджане / Х. А. Исмаилов – Баку: Элм, 1988. – 148 с.

31. Catalogue of gene symbols for wheat: 2013-14 supplement / R. A. McIntosh, J. Dubcovsky, W. J. Rogers, C. F. Morris, R. Appels and X. C. Xia // Annual Wheat Newsletter. – 2014. – Vol. 60. – P. 153-175.

32. Пантелеев, В. К. Бура іржа пшениці. Вірулентність епітопуляцій збудника на проміжних рослинах-живителях у східному Лісостепу / В. К. Пантелеев // Захист рослин. – 2000. – № 2. – С. 5-7.

33. Пантелеев, В. К. Гени стійкості пшениці. Ефективність проти листкової іржі / В. К. Пантелеев // Захист рослин. – 2000. – № 7. – С. 5-7

34. Rees, R. G. Effects of yellow spot on wheat: Comparison of epidemics at different stages of crop development / R. G. Rees and G. J. Platz // Aust. J. Agric. Res. – 1983. – Vol. 34. – P. 39-46.

35. Catalogue of gene symbols for wheat / R. A. McIntosh, Y. Yamazaki, J. Dubcovsky, J. Rogers, C. Morris, J. Somers, R. Appels, K. M. Devos // KOMUGI-integrated wheat science. 2013. Database at <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>.

36. Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat / R. Effertz, S. W. Meinhardt, J. A. Anderson [et al.] // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92. – P. 527-533.

37. Sarova, J. *Pyrenophora tritici-repentis* - an important wheat leaf spot pathogen in the Czech Republic / J. Sarova, A. Hanzalova. European Wheat Aneuploid Co-operative Newsletter. Proceedings of the 13th International EWAC Conference 27 June – 1 July 2005, Prague, Czech Republic. – 2005. – P. 136-138.

38. Смурова, С. Г. Характеристика устойчивости видов *Aegilops* L. к желтой и темно-бурой пятнистостям листьев / С. Г. Смурова, Н. М. Коваленко, Н. Н. Чикида, Л. А. Михайлова // 36. наук. праць СГП-НАЦ НАС. – 2008. – Вип. 11 (51). – С. 109-113.

39. Леонов, О. Ю. Моніторинг стійкості до піренофорозу серед сучасних сортів та ліній пшениці м'якої / О. Ю. Леонов // Вісник центру наукового забезпечення АПВ Харківської області. – 2011. – № 10. – С. 133-143.

40. Механізми резистентності зернових культур до збудників фузаріозів.

Фузаріози культурних рослин. Монографія / В.В. Швартау, О.Л. Зозуля, Л.М. Михальська, О.Ю. Санін. – К.: Логос, 2016. – 164 с.

41. Характеристика нових сортів пшениці м'якої озимої миронівської селекції за алейним станом гена стійкості проти збудника бурої іржі *Lr34* / Г. М.

Ковалишина, Ю. М. Дмитренко, А. В. Карелов та ін. // Агронімія. Том 10, №3-4, 2018. – С. 139-146.

42. ДНК технології в реєстрації й охороні прав на сорти рослин / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова, 2003, с. 66-74.

43. Геном рослин і «молекулярна селекція» / Ю. М. Сиволап // Селекція і насінництво. 2008, с. 34-42.

44. Брик А.Ф., Календар О.Н., Стратула О.Р., Сиволап Ю.М. IRAP-аналіз сортів ячменя Одеської селекції. // Цитологія і генетика. – Т. 40. – №3. – 2006. – С. 24-33

45. Стратула О.Р., Сиволап Ю.М. Аллельні характеристики гена β -амілази сортів ячменя України // Цитологія і генетика. – Т. 40. – № 4. – 2007. – С. 20-26

46. Петрова И.В., Чебогарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Идентификация Wx-генотипов среди сортов озимой пшеницы // Цитология и генетика. – Т.41. – № 88. – 2007. – С. 11-17.

47. Пшениця м'яка. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D1%88%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%86%D1%8F%D0%BC%27%D1%8F%D0%BA%D0%B0>

48. Озима пшениця: характеристика, посів, збирання і зберігання.

[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bizontech.ua/blog/winter-wheat-characteristics-sowing-harvesting-storage>

49. Молекулярно-генетичні маркери для ідентифікації генів стійкості до грибкових захворювань пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) / Галаєв О. В., Бабаяни Л. Т. // Збірник наукових праць СГІ-НЦНС. 2015. Випуск 25 (65). – с. 61-75.

50. Оцінка сортів пшениці м'якої за геном Tsn1 чутливості до токсину А *Pyrenophora tritici-repentis* / І. І. Кучерявий, А. В. Карелов, О. І. Созінова // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції КПІ ім. Ігоря Сікорського – Київ, 19 квітня 2019. – 165 с.

51. Алейний стан маркерів гена, асоційованого із чутливістю до токсину А *Pyrenophora tritici-repentis* і *Stagonospora nodorum*, серед сортів м'якої пшениці степової зони України / А. В. Карелов, Н. О. Козуб, Л. О. Созінов // Захист і карантин рослин 2014. Випуск 60. – с. 120-127.

52. Поліморфізм за SSR-локусами 3D хромосоми серед генотипів пшениці – реципієнтів чужинного гена стійкості до борошнистої роси / М. З. Антонюк, М. В. Бодильова, Т. С. Сфіменко // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2010, том 8, № 1. – с. 10-17.

53. Ідентифікація і валідація мікросателітного маркера до транслокації Amigo-типу 1BL/1RS-3Ac#1L, що містить гени стійкості Lr14/Sr24 у м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) / О. В. Галаєв // Збірник наукових праць СГІ-НЦНС 2017. Вип. 29 (69). – с. 62-72.

54. Sambasivam P. An overview of genetic rust resistance: From broad to specific mechanisms / Sambasivam Periyannan, Ricky J. Milne, Melania Figueroa, Evans S. Lagudah, Peter N. Dodds // PLOS Pathogens. – 2017. – P. 1-6.

55. Молекулярна оцінка генів стійкості до збудника стеблової іржі у пшениці м'якої / Кучерявий І. І., Карелов А. В., Созінова О. І., Бородай В. В. // Біотехнологія звершення та надії: збірник тез IX Всеукраїнської науково-практичної онлайн конференції, 20-21 травня 2021 року, с. 89-91.

56. Сучасний стан досліджень запасних білків пшениці / В. М. Ючинок, О. М. Радченко // Фізіологія і біохімія культурних рослин, 2011, том 43, с. 255-266.

57. Біотехнологічна оцінка сортів пшениці м'якої на виявлення гену стійкості

Lr34 до збудника бурої іржі / Кучерявий І. І., Карелов А. В., Созінова О. І.

// Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських

культур: матеріали Х Міжнародної науково-практичної конференції

молодих вчених і спеціалістів НААН, МПП ім. В. М. Ремесла, М-во

розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства, Укр. ін-т

експертизи сортів рослин (с. Центральне, 23 квітня 2021 р.), © 65.

58. Flor, H. H. Host-parasite interaction in flax rust—its genetics and other implications / H. H. Flor // *Phytopathology*. — 1955. — Vol. 45. — P. 680–685.

59. Чесноков, Ю. В. Устойчивость растений к патогенам: (обзор иностранной

литературы) / Ю. В. Чесноков // *Сельскохозяйственная биология*. — 2007. —

№ 1. — С. 16–35.

60. Пухальский, В. А. Проблемы естественного и приобретенного иммунитета растений. К развитию идей Н. И. Вавилова / В. А. Пухальский, Т. И.

Одинцова, Л. И. Извекова [и др.] // *Вестник ВОГиС*. — 2007. — Том 11, №

3/4. — С. 631–649.

61. Ciuffetti, L. M. Advances in the characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis*–wheat interaction / L. M. Ciuffetti and R. P. Turoni // *Phytopathology*. —

1999. — Vol. 89. — P. 444–449.

62. Хвороби пшениці, поширені в Україні: шкідливість, генетичний контроль

та результативність селекції на стійкість [Електронний ресурс]. Режим

доступу: https://agromage.com/stat_id.php?id=1058

63. Kolmer, J. A. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central

Asia and the Caucasus / J. A. Kolmer and M. E. Ordonez // *Phytopathology*. —

2007. — Vol. 97. — P. 1141–1149.

64. Ковалишина Г. М. Генетичний контроль стійкості проти бурої іржі у

сортів озимої пшениці / Г. М. Ковалишина, Г. П. Марусин // *Науково-*

технічний бюлетень Міронівського інституту пшениці ім. В. М. Ремесла.

— 2004 — Випуск 3. — С. 15-20.

65. Лісова, Т. М. Ефективні гени стійкості пшениці до збудника бурого іржі і расовий склад популяції патогена станом на 1998 рік / Т. М. Лісова, О. О.

Созінов // Агроекологія і біотехнологія. Збірник наукових праць. — 1998. — Вип. 2 — С. 245-253.

66. Бабаянц, Л. Т. Новые интрогрессированные гены устойчивости к фитопатогенам и их использование в селекции пшеницы на иммунитет / Л.

Т. Бабаянц, О. В. Бабаянц // Збірник наукових праць СГІ-НАЦ НАІС. — 2008. — Випуск 11 (51). — С. 12-20.

67. McMullen, M. P. Tan spot of wheat / M. P. McMullen, L. Leonard Franc // North Dakota State University of Agriculture and Applied Science. — BF-766

(Revised), January 2003. — Available from:

<http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp766w.htm>.

68. Lamari, L. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* / L. Lamari, C. C. Bernier //

Phytopathology. — 1991. — Vol. 81. — P. 1092-1095.

69. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat / L.

Lamari, S. E. Strelkov, A. Yahyaoui [et al] // Phytopathology. — 2003. — Vol. 93. — P. 391-396.

70. Tuori R.P. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis* / R.P. Tuori, T.J. Wolpert, L.M.

Ciuffetti // Mol Plant Microbe Interact. — 1995. — Vol. 8, No 1. P. 41-48.

71. Manning V.A. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein / V.A. Manning, L.K. Hardison, L.M. Ciuffetti // MPMI. — 2007. — Vol. 20, No. 2. — P.

168-177.

72. Михайлова, Л. А. Характеристика популяцій *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентності / Л. А. Михайлова, Н. Г. Тернюк, Н. В. Мироненко, К. В.

НОВОЖИЛОВ // 36. наук. праць СГП-НАЦ НАС. – 2008. – Випуск 11 (51). – С. 84-93.

73. Palicova-Sarova, J. Reaction of 50 winter wheat cultivars grown in the Czech Republic to *Pyrenophora tritici-repentis* races T, 3, and 6 / J. Palicova-Sarova, A. Hanzalova // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2006. – Vol. 42 (2). – P. 31–37.

74. Lamari, L. Forensic pathology of Canadian bread wheat: The case of tan spot / L. Lamari, B. D. McCallum and R. M. DePaauw // Phytopathology. – 2005. – Vol. 95. – P. 144-152.

75. Identification of new sources of resistance to tan spot, *Stagonospora nodorum* blotch, and *Septoria tritici* blotch of wheat / P. K. Singh, M. Mergoum, S. Ali et al. // Crop Sci. – 2006. – Vol. 46. – P. 2047–2053.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ